

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Dezember 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/92298 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/00** (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06166

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Mai 2001 (30.05.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 100 26 713.0 30. Mai 2000 (30.05.2000) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **SEBALD, Walter** [DE/DE]; Meyer-Ober-slebenstrasse 7, 97070 Würzburg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **NICKEL, Joachim** [DE/DE]; Kettelerstrasse 28, 97222 Rimpar (DE).

(74) Anwalt: **GRÜNECKER KINKELDEY STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER**; Maximilianstrasse 58, 80538 München (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MUTEINS OF A CHAIN OF A PROTEIN FROM THE SUPERFAMILY OF GROWTH FACTOR TGF-\$G(B)

(54) Bezeichnung: MUTEINE EINER KETTE EINES PROTEINS AUS DER SUPERFAMILIE DES WACHSTUMSFAKTORS TGF- β

(57) Abstract: The invention relates to muteins of a chain of a protein from the superfamily of growth factor TGF- β having antagonistic and/or partially agonistic activity. The factors of the TGF- β superfamily each perform their own specific function in the organism. An overexpression of these proteins can have serious consequences for the affected patient, e.g. ectopic bone formation or psoriasis. In order to be able to confront these pathophysiological effects, inhibitors for these factors should be developed. To this end, the invention provides muteins of a chain of a protein from the superfamily of growth factor TGF- β , which exhibit antagonistic and/or partially agonistic activity after the formation of a homodimer, whereby the muteins are modified at one or more positions which, in an unaltered protein, are involved in a low-affinity binding of the protein to the receptor thereof. The inventive muteins are of interest for the prophylaxis and treatment of illnesses, which are caused by an overexpression of factors of the TGF- β superfamily.

A2

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Muteine einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β mit antagonistischer und/oder partiell agonistischer Aktivität. Die Faktoren der TGF- β Superfamilie üben im Organismus eine jeweils eigene spezifische Funktion aus. Eine Überexpression dieser Proteine kann für den betroffenen Patienten gravierende Folgen haben, z.B. ektopische Knochenbildung oder Psoriasis. Um diesen pathophysiologischen Wirkungen begegnen zu können, sollen Hemmstoffe für diese Faktoren entwickelt werden. Die Erfindung stellt Muteine einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β zur Verfügung, die nach Bildung eines Homodimers antagonistisch und/oder partiell agonistische Aktivität aufweisen, wobei die Muteine an einer oder mehreren Positionen verändert sind, die im unveränderten Protein an einer niederaffinen Bindung des Proteins an seinen Rezeptor beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen Muteine sind von Interesse für die Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen, die durch eine Überexpression von Faktoren der TGF- β Superfamilie hervorgerufen werden.

WO 01/92298

Muteine einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β

Die vorliegende Erfindung betrifft Muteine einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β mit antagonistischer und/oder partiell agonistischer Aktivität, Derivate eines Proteins aus der TGF- β Superfamilie, pharmazeutische Zusammensetzungen, die die erfindungsgemäßen Muteine und/oder Derivate umfassen sowie die für die Muteine oder Derivate davon kodierenden Nukleinsäuren.

Die Protein-Familie des TGF- (transformierender Wachstumsfaktor)- β umfasst eine große Anzahl von strukturell verwandten Polypeptid-Wachstumsfaktoren, deren jeder eine faszinierende Reihe zellulärer Prozesse, einschließlich der Zellproliferation, Zellliniendetermination, Differenzierung, Mobilität, Adhäsion und Zelltod reguliert. Die Faktoren werden entsprechend komplexer zeitlicher und gewebespezifischer Muster exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Homöostase und Reparatur von nahezu allen Geweben in eukaryontischen Organismen, von der Fruchtfliege bis hin zum Menschen. Insgesamt sind diese Faktoren für einen wesentlichen Teil der intrazellulären Signale verantwortlich, die das Zellschicksal bestimmen.

Eine Reihe von Arbeiten der vergangenen Jahre hat zur Aufklärung des TGF- β -Signaltransduktionsweges geführt. Die Signaltransduktion involviert Rezeptor-Serinkinasen an der Zelloberfläche, deren Substrate, die SMAD-Proteine, nach Phosphorylierung in den Kern wandern, wo sie die Transkription des Zielgenes in Zusammenarbeit mit DNA-bindenden Partnern aktivieren. Die multifunktionelle Natur von TGF- β und der weiteren zur TGF- β Superfamilie gehörenden Faktoren scheint auf dem Zusammenspiel unterschiedlicher Rezeptoren, SMAD-Proteine und DNA-bindender Proteine zu beruhen. Störungen dieses Signal-Transduktionsweges sind die Ursache verschiedener Formen menschlicher Karzinome und Entwicklungsstörungen.

Die TGF- β -Superfamilie umfasst verschiedene Subfamilien mit jeweils zwei bis 4 Mitgliedern. Eine ausführliche Übersicht über die verschiedenen Subfamilien und deren Eigenschaften ist z.B. in Massague (1998) gegeben.

Die folgende Tabelle I gibt einen Überblick über einige der wichtigsten bis heute bekannten etwa 20 Mitglieder der TGF- β Superfamilie, die als "bone morphogenetic proteins" und "growth and differentiation factors" die Neubildung und Regenerierung von Gewebe im erwachsenen Organismus steuern sowie an frühen und späten Schritten der Embryonalentwicklung wesentlich beteiligt sind.

Tabelle I

Namen	% Identität	Typische Aktivitäten	Pathophysiologie
BMP-2	100	Knochen- und Knorpel-Entwicklung; Embryonal-Entwicklung, Apoptose	Ektopie Knochenbildung
BMP-4	92		
BMP-5	61	Beitrag zur Entwicklung beinahe aller Organe	Ektopie Knochenbildung;
BMP-6	61		Psoriasis (BMP-6)
BMP-7/OP1	60		
BMP-8/OP2	55		
GDF-5/CDMP1	57	Knorpelbildung in der	
GDF-6/CDMP2	54	Gliedmaßenentwicklung	
GDF-7	57		
GDF-8/Myostatin	41	Homöostase von Skelettmuskeln	Muskeldegeneration?
TGF- β 1	35	Wachstumshemmung,	Fibrose, Narbenbildung
TGF- β 2	34	Synthese von	
TGF- β 3	36	extrazellulärer Matrix	

Obwohl die Aminosäure-Primärsequenzen der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, wie aus der Tabelle ersichtlich, untereinander teilweise relativ geringe Übereinstimmungen aufweisen, gibt es allen Proteinen der verschiedenen Subfamilien gemeinsame strukturelle Merkmale. So sind z.B. alle Proteine der Superfamilie Dimere, die aus zwei meist identischen Monomeren aufgebaut sind. Eine weitere Gemeinsamkeit ist der Signaltransduktionsweg: alle TGF- β -ähnlichen Proteinfaktoren signalisieren über zelluläre Rezeptoren, die aus zwei verschiedenen Typen von Serinkinase-Rezeptorketten zusammengesetzt sind. Die Typ I-Kette weist eine cytoplasmatische GS-Box und eine Serinkinase auf, die die zellulären SMAD1- und -5-Signalproteine aktiviert. Die Typ II-Kette aktiviert eine Typ I-Rezeptor-Serinkinase durch Transphosphorylierung des GS-Box-Segmentes. Die kleinen Rezeptor-Ektodomänen der Typ I- bzw. Typ II-Ketten, jeweils 120 bis 150 Aminosäuren lang, zeigen untereinander nur eine sehr geringe Ähnlichkeit, und auch verschiedene Ketten des gleichen Typs sind relativ wenig konserviert. Ein gemeinsames Merkmal aller bekannten Rezeptorketten der TGF- β -Superfamilie sind jedoch vier konservierte Disulfidbrücken; zusätzliche Disulfidbrücken und die Positionen einiger weniger Aminosäurereste scheinen für entweder Typ I- oder Typ II-Rezeptorproteine charakteristisch zu sein.

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie zerfallen jedoch hinsichtlich ihres Bindungsmechanismus in 2 Gruppen, die der TGF- β -/Aktivin-ähnlichen Proteine und die der BMP (bone-morphogenetic protein) -2-ähnlichen Proteine.

Für den Namenspatron der Superfamilie, d. h. TGF- β , ist ein geordneter sequentieller Mechanismus der Bindung an seine zellulären Rezeptoren beschrieben worden. Demnach bindet zunächst ein externer Ligand an die Typ II-Rezeptorkette und anschließend wird Typ I-Rezeptor aus der Membran in den Komplex rekrutiert. Dementsprechend stellt die Typ II-Kette den für TGF- β hochaffinen Rezeptor dar. Für die Wechselwirkung von Aktivinen mit ihren Rezeptoren scheint es einen vergleichbaren Mechanismus zu geben. Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, deren Bindungsmechanismus mit dem für TGF- β beschriebenen übereinstimmt, wurden deshalb zusammenfassend als TGF- β -/Aktivin-ähnliche Proteine bezeichnet. Zu diesen werden alle Mitglieder der TGF- β -Superfamilie gerechnet, die N-terminal eine 4. Disulfidbrücke

aufweisen. Dies sind nach heutigem Kenntnisstand TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, alle Aktivine und Inhibine sowie BMP-11 und GDF-8.

Die Bindung von BMP-2 an seine zellulären Rezeptoren folgt jedoch einem Mechanismus, der sich von dem für die TGF- β -/Aktivin-ähnlichen Proteine etablierten unterscheidet. Im Gegensatz zu Situation bei TGF- β sind die Hochaffinitäts-Rezeptoren für BMP-2 die Typ I-Ketten BMPR-IA, BMPR-IB und möglicherweise auch ActR-I. Typ II-Ketten selbst können gelöstes BMP-2 zwar ebenfalls binden, jedoch mit weitaus geringerer Affinität. Daraus ist geschlossen worden, dass die Reihenfolge der Typ I- und Typ II-Rezeptor-Wechselwirkung mit BMP-2 im Vergleich zu der für TGF- β etablierten Reihenfolge umgekehrt ist. Die für die TGF- β -/Aktivin-ähnlichen Proteine gewonnenen Erkenntnisse können daher nicht auf BMP-2 und Faktoren mit ähnlichem Mechanismus, wie z. B. BMP-4, -5, -6 und -7, GDF-5, -6, -7 (BMP-2-ähnliche Faktoren) übertragen werden.

Für keinen der Typ I- oder Typ II-Rezeptoren ist bis heute ein Epitop auf dem entsprechenden Liganden lokalisiert und charakterisiert worden. Für TGF- β 1 und Aktivin A sind Mutantenproteine konstruiert und analysiert worden, die eine veränderte biologische Aktivität und Rezeptorbindungsaffinität aufweisen. Für BMP-2 sind synthetische Peptide beschrieben worden, die den Schlaufen von BMP-2 entsprechen und die die BMP-2 Aktivität inhibieren (EP 691 349).

Alle Faktoren der TGF- β Superfamilie, auch die nahe verwandten Vertreter einer Untergruppe, üben im Organismus eine eigene spezifische Funktion aus, die sich in der zell- und stadienspezifischen Expression der Gene sowie in Auswirkungen von Mutationen zeigt. Die Inaktivierung von BMP- oder GDF-Genen kann in Säugetieren zum Absterben in verschiedenen Embryonalstadien (BMP-2, BMP-4) oder in der perinatalen Periode (BMP-7) führen; des weiteren sind spezifische Änderungen der Entwicklung von Skelettelementen (GDF-5, BMP-5) beobachtet worden. Durch Überexpression der Proteine kann es zu ektoper Knochenbildung (BMP-2, BMP-4 und andere), Psoriasis (BMP-6), Neuritenneubildung (GDF-5) oder zur Regenerierung von ischämischen Nierenschäden (BMP-7) kommen. Eine Überexpression von GDF-8 (Myostatin) führt möglicherweise zu Muskelschwund. Problematisch ist auch die durch

TGF- β induzierte Wucherung der extrazellulären Matrix bei Fibrose, Narbenbildung oder Zirrhose.

Um einer pathophysiologischen Wirkung der Proteine aus der TGF- β -Superfamilie vorbeugen bzw. entgegentreten zu können, wäre es daher überaus wünschenswert, Hemmstoffe für diese Faktoren zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist es somit, Mittel bereitzustellen, mit der die pathophysiologischen Wirkungen von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie vermindert werden können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch ein Mutein einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β , wobei das Mutein nach Bildung eines Homodimers antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweist, wobei das Mutein an einer oder mehreren Position(en) verändert ist, die im unveränderten Protein an einer niederaffinen Bindung an seinen Rezeptor beteiligt ist/sind.

Unter einem Antagonisten werden erfindungsgemäß Proteine verstanden, die an die Rezeptoren für die natürlichen Proteine der Super-Familie des Wachstumsfaktors TGF- β binden, mit ihrer Bindung jedoch die normalen biologischen Folgereaktionen nicht auslösen. Nach Bindung eines Antagonisten findet daher keine Signaltransduktion statt. Unter „partiell agonistischer Aktivität“ wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Aktivität verstanden, die zwar in gewissem Umfang die normalen biologischen Folgereaktionen auslöst, das Ausmaß dieser Folgereaktionen jedoch weit hinter der durch den ein natürliches Protein ausgelösten Folgereaktion zurückbleibt. Unter einer partiell agonistischen Aktivität wird daher im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Aktivität verstanden, die weniger als 80 %, bevorzugt weniger als 50 % und besonders bevorzugt weniger als 25 % der Aktivität des entsprechenden natürlichen Proteins aufweist. Die Aktivität kann dabei z. B. durch den C2C12-Test bestimmt werden, der nachfolgend im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben ist.

Unter einer „niederaffinen Bindung“ wird im Zusammenhang mit der BMP-2-ähnlichen Subfamilie eine Bindung verstanden, die erst bei einer Konzentration des Liganden von 10 nM oder mehr, oft sogar von mehr als 100 nM oder 1 µM, zu einer halbmaximalen Sättigung des Rezeptorproteins führt. Im Gegensatz dazu wird unter einer „hochaffinen Bindung“ eine Bindung verstanden, die bereits bei einer Konzentration des Liganden von weniger als 10 nM, oft sogar bereits von weniger als 1 nM, zu einer halbmaximalen Sättigung eines Rezeptorproteins führt. Die Sättigung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration kann dabei mittels eines Biosensorsystems gemessen werden, wie es in Beispiel 4 beschrieben ist.

In Verbindung mit der Subfamilie der TGF-β/Aktivin ähnlichen Proteine ermöglicht eine „hochaffine“ Bindung die Bindung des Liganden an den Rezeptortyp II auch in Abwesenheit von Rezeptortyp I, wie sich in ganzen Zellen durch chemische Quervernetzung mit radioaktiv markierten Liganden nachweisen lässt. Im Gegensatz dazu ist die „niederaffine“ Bindung des Liganden an die Rezeptorkette I in Abwesenheit der Typ II Kette mit nur sehr geringer Effizienz möglich und wird in Gegenwart der Typ II Kette verstärkt. Dies lässt sich ebenfalls durch Quervernetzung mit radioaktiv markierten Liganden überprüfen (siehe z.B. Massague 1998; Wuytens et al., 1999).

Unter einem „unveränderten Protein“ wird ein Wachstumsfaktor aus der TGF-β-Superfamilie in der Form verstanden, in der er natürlicherweise in einem Säugetier gefunden wird und biologische Aktivität ausübt. Die Angabe „an einer oder mehreren Position(en)“ bedeutet, dass im Mutein ggf. nur eine einzige Aminosäure verändert ist, dass aber, z. B. wo weiterreichende Deletionen durchgeführt worden sind, auch eine größere Anzahl von Aminosäuren verändert sein kann. In bevorzugten Ausführungsformen sind zwischen 1 bis 50, besonders bevorzugt 1 bis 25 oder 1 bis 10, ganz besonders bevorzugt zwischen 1 bis 5 Aminosäuren verändert.

Erfindungsgemäß können die Muteine eine Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren aufweisen, wobei sich die Deletion mehrerer Aminosäuren auf mehrere Positionen der Proteinkette beziehen kann. Bevorzugt sind jedoch Muteine, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren durch andere Aminosäuren substituiert sind, wobei die mehreren Aminosäuren benachbart oder nicht benachbart sein können. Bevorzugt ist dabei eine

nicht konservative Substitution, besonders bevorzugt die Substitution durch eine Aminosäure mit andersartiger Ladung oder anderer Größe. Dazu sei folgendes erläutert: Grundsätzlich werden vier physikochemische Gruppen unterschieden, in die die natürlicherweise vorkommenden Aminosäuren eingeteilt werden. Zur Gruppe der basischen Aminosäuren gehören Arginin, Lysin und Histidin. Zur Gruppe der sauren Aminosäuren gehören Glutaminsäure und Asparginsäure. Die ungeladenen/polaren Aminosäuren umfassen Glutamin, Aspargin, Serin, Threonin und Tyrosin. Die nicht polaren Aminosäuren umfassen Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Cystein, Glycin, Alanin, Valin und Prolin, Leucin und Isoleucin. Eine nicht konservative Substitution bedeutet in diesem Zusammenhang den Austausch einer gegebenen Aminosäure durch eine Aminosäure einer anderen physikochemischen Gruppe. Besonders bevorzugt ist der Austausch einer Aminosäure einer ersten Gruppe durch eine Aminosäure einer zweiten Gruppe, wobei die Aminosäuren der zweiten Gruppe eine andere Ladung als die Aminosäuren der ersten Gruppe aufweisen.

Bevorzugt ist außerdem der Austausch einer großen Aminosäure durch eine der kleinen Aminosäuren Glycin, Alanin oder Serin. Bevorzugt ist weiterhin der Austausch einer der kleinen Aminosäuren durch eine der großen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin oder Glutamin.

In einer dritten Ausführungsform werden ein oder mehrere Aminosäuren insertiert. Insertionen mehrerer Aminosäuren können an einer Position oder an mehreren Positionen der Kette auftreten.

In einer weiteren Ausführungsform werden ein oder mehrere der angegebenen Aminosäurereste chemisch modifiziert. Bei der Modifikation kann es sich z. B. um die kovalente Verbindung mit einem oder mehreren Resten handeln, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind: Carbonsäuren, Amine, Polyethylenglycol, Biotin und Zucker (DeSantis et al., 1999).

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Mutein von einer Kette eines BMP-2-ähnlichen Proteins abgeleitet. Zur Familie der BMP-2-ähnlichen Proteine gehören die BMP-2 Subfamilie, BMF-5 Subfamilie und GDF-5 Subfamilie (s. Klassifizierung dieser

Familien von Massague (1998)). Wie auch aus Tabelle I hervorgeht, weisen dabei die Mitglieder der BMP-2 Subfamilie untereinander eine Identität von 92% auf, während die Mitglieder der BMP-5 und der GDF-5 Subfamilie eine Identität von 54 bis 61%, bezogen auf BMP-2 aufweisen. Für die Angehörigen dieser drei Subfamilien wird davon ausgegangen, dass sie dem oben erwähnten Reaktionsmechanismus, der für BMP-2 nachgewiesen worden ist, folgen, d.h., dass sie im Gegensatz zu den TGF- β s oder Aktivinen zunächst mit hoher Affinität an die Typ I-Ketten BMPR-IA, BMPR-IB und möglicherweise auch ActR-I binden.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass Muteine mit partiell agonistischer bzw. antagonistischer Wirkung solche Muteine sind, bei der in der von BMP-2, BMP-4, BMP-5 usw. abgeleiteten Proteinkette mindestens eine Aminosäure aus dem Bindungsepitop für den natürlichen BMP-Rezeptor II deletiert, substituiert oder modifiziert oder mindestens eine Aminosäure in das Bindungsepitop insertiert ist. Die Erfinder haben im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Bindungsepitope für alle beteiligten Rezeptoren bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Aminosäure-Positionen von BMP-2, die die Bindungsaffinität für die BMPR-IA- oder BMPR-II-Rezeptorketten bestimmen, zwei einander nicht überlappende Sets bilden. In Figur 1 ist gezeigt, dass diese Determinanten über die gesamte BMP-2 Sequenz verteilt sind. Das räumliche Modell in Fig. 5 zeigt, dass die funktionellen Reste zwei getrennte Epitope auf der Oberfläche des homodimeren BMP-2 Moleküls bilden.

Im ersten Epitop, das Reste aus beiden Untereinheiten umfasst, sind die Determinanten für die BMPR-IA Wechselwirkungen angeordnet. In Fig. 5 sind die Aminosäurerreste des ersten Epitops auf einer ersten Untereinheit kursiv dargestellt, während die Aminosäurerreste des ersten Epitops auf einer zweiten Untereinheit durch normale Buchstaben gekennzeichnet sind. Das Epitop ist hochdiskontinuierlich und umfasst Reste aus dem β 1-Faltblatt, der Schlaufe vor der Helix α 3 und die Helix α 3 von einem Monomer sowie Teile der großen ω -Schlaufe zwischen den Faltblättern β 2 und β 3 sowie das Faltblatt β 8 des anderen Monomers. Eines der Monomere trägt so die Reste V26, D30 und W31 aus dem β -Faltblatt-Bereichen β -2 und β 3 sowie die Reste K101 und Y103 aus dem β -Faltblatt-Bereich β 8 bei. Das andere Monomer trägt die Reste I62, L66, N68 und S69 aus der Helix α 3 sowie die Reste F49, P50, A52 und H54 aus dem

Bereich vor der Helix α 3 bei. Auf Grund der räumlichen Struktur des Monomers wird dieses Epitop als „Wrist“-Epitop bezeichnet: Die Monomere werden mit einer offenen Hand verglichen, bei der die zentrale Helix α 3 das Handgelenk und 2 nebeneinander angeordnete β -Faltblätter die 4 Finger darstellen; die Schlaufen 1 und 2 entsprechen den Fingerspitzen jeden Fingerpaars. Das N-terminale Segment findet sich an der Position des Daumens. Folglich befindet sich das erste Epitop, das um die zentrale α -Helix angeordnet ist, am Handgelenk (Wrist). Es hat Ausmaße von ungefähr 2 x 2,5 bis 3 nm. Diese Ausdehnung ist mit der Funktion als hochaffiner Wechselwirkungsstelle kompatibel.

Das zweite Epitop, das auf der Handrückseite nahe den äußeren Fingersegmenten angeordnet ist, ist für die niederaffine Bindung von BMP-2 an den BMPR-II verantwortlich. Es setzt sich nur aus Aminosäureresten einer Untereinheit zusammen und wird auch als „Knuckle“-Epitop bezeichnet. Die Aminosäurereste A34 und H39 sind in den β -Faltblättern β -3 bzw. β -4 angeordnet, die Aminosäurereste S88 und L90 im Faltblatt β -7 und L100 im Faltblatt β -8. Vom Aminosäurerest E109 nehmen die Erfinder an, dass er ein weiterer für den Kontakt wichtiger Aminosäurerest ist. Das zweite Epitop scheint sehr viel kleiner als das erste Epitop zu sein, da viele Aminosäurereste an den Grenzen des zweiten Epitops ohne sichtbare Wirkungen auf die Rezeptorbindung oder die biologische Aktivität modifiziert werden können. Es kann gegenwärtig jedoch noch nicht ausgeschlossen werden, dass das Epitop weitere funktionelle Aminosäurereste enthält.

Die beiden Epitope sind voneinander funktionell und räumlich getrennt. Von allen Bindungsdeterminanten wurde festgestellt, dass sie entweder für BMPR-I (Typ I) oder BMPR-II/ActR-II (Typ II) spezifisch sind. Am Fall von BMP-2 konnten antagonistische Muteine lediglich für das Knuckle-Epitop gefunden werden. Die verschiedenen Epitope sind durch Bindungsdeterminanten definiert und durch neutrale Reste voneinander abgegrenzt. Sie bilden nicht überlappende Bereich auf der Oberfläche der etablierten 3-dimensionalen Struktur von BMP-2. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass während der Typ I und Typ II Rezeptorbindung kooperative Effekte auftreten. Das Wrist-Epitop und das Knuckle-Epitop sind voneinander nur durch die Dicke eines β -Faltblatts getrennt, das die Konformation nach Bindung an die Ektodomäne ändern kann und auf

diese Art und Weise kooperative Wirkungen vermitteln kann. Die räumliche Trennung der Epitope legt es weiter nahe, dass jeder der mit der Symmetrie zusammenhängenden Teile des dimeren BMP-2 Moleküls ein Paar funktionelle Epitope enthält und das zwei unabhängige Wrist-Epitope und zwei unabhängige Knuckle-Epitope insgesamt 4 Rezeptorketten binden können. Ein Komplex zwischen einem BMP-2 und zwei BMPR-IA Ektodomänen ist bereits identifiziert worden (Kirsch et al., 2000(c)).

Keines der Epitope weist jedoch die typischen Ladungsmuster auf, wie sie kürzlich für Rezeptoren diskutiert wurden (Griffith et al. 1996).

Ohne an diese Theorie gebunden sein zu wollen, wird angenommen, dass die erfindungsgemäßen BMP-2 Antagonisten höchstwahrscheinlich eine Folge des geordneten sequentiellen Bindungsmechanismus sind, der die Rezeptoraktivierung bewirkt. Dem Modell zufolge blockiert der Antagonist die hochaffine Typ I Rezeptorkette mit seinem intakten Wrist-Epitop, und das durch Substitution, Deletion, Modifikation oder Insertion veränderte Knuckle-Epitop verhindert die sich daran anschließende Oligomerisierung mit niedrig affinen Typ II Rezeptorketten. Der vergleichsweise niedrige IC₅₀ der Antagonisten sowie ihre effiziente Kompetition mit BMP-2 um die Rezeptorbindung weisen darauf hin, dass es überwiegend die Typ I Ketten sind, die die Bindung von BMP-2 an den gesamten Rezeptorkomplex steuern, möglicherweise indem sie die Assoziationsgeschwindigkeit für BMP-2 bestimmen. Die Halbwertszeit des Komplexes zwischen BMP-2 und dem Typ I Rezeptor von mehr als 30 Minuten führt höchstwahrscheinlich dazu, dass die Bindung an den zellulären Rezeptor irreversibel ist. Eine interessante Beobachtung ist in diesem Zusammenhang die niedrige Restaktivität der hoch antagonistischen Mutante A34D und L90A im C2C12-Test, wenn man berücksichtigt, dass die Bindung an die Ektodomänen der Typ II Rezeptorketten nur ungefähr 5 bis 15-fach verringert ist. Möglicherweise ist die gleichzeitige Bindung von zwei Typ II Ketten für eine effiziente Rezeptoraktivierung notwendig, so dass eine Abnahme der Bindungsaffinität sich stärker auswirkt.

Da die anderen BMP-2-ähnlichen Proteine ihre entsprechenden Rezeptoren nach dem gleichen Mechanismus aktivieren, wie er für BMP-2 gezeigt worden ist, d. h., über ein

Hochaffinitäts-Wrist-Epitop und ein Niedrigaffinitäts-Knuckle-Epitop, können auch antagonistische Muteine dieser Proteine durch Aminosäuresubstitutionen im Knuckle-Epitop erzeugt werden.

In bevorzugten Ausführungsformen werden ein oder mehrere der Aminosäurereste, die die oberflächenexponierten Bereiche aus den β -Faltblattstrukturen β -3, β -4, β -7, β -8 oder β -9 bilden, verändert. Bei diesen oberflächenexponierten Resten handelt es sich um folgende:

β -3: V33, A34

zwischen β -3 und β -4 : P35, P36;

β -4: G37, Y38, H39;

nach β -4: F41, Y42;

β -6: T82, E83, L84, S85;

β -7: A86, I87, S88, L90;

β -8: K97, V98, V99, L100;

β -9: V107, E109, G110.

In einer ersten Ausführungsform werden einer oder mehrere der angegebenen Aminosäurereste einzeln oder in Gruppen von bis zu 5 Aminosäuren deletiert. Bevorzugt werden Aminosäuren deletiert, für die eine Wechselwirkung mit dem BMP-Rezeptor II belegt ist oder deren Deletion Auswirkungen auf die Konformation des „Knuckle“-Epitopes hat. Durch Kombination einer Substitution mit einer Insertion und/oder Deletion oder auch durch Kombination einer Insertion mit einer Deletion lassen sich weitere Muteine herstellen, die gegebenenfalls eine verringerte Affinität für den BMP-Rezeptor II aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit, ausgehend von der bekannten Sequenz eines Monomers für BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6 oder GDF-7, zu antagonistischen oder partiell agonistischen Muteinen zu kommen, besteht in der Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren in die oberflächenexponierten Bereiche des „Knuckle“-Epitops. Prinzipiell müssen diese Aminosäuren ebenfalls den Zweck erfüllen, die Bindung an den BMP-Rezeptor II zu schwächen oder zu verhindern.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Mutein um eine Kette eines BMP-2-ähnlichen Proteins, wobei eine oder mehrere der folgenden Aminosäuren aus BMP-2 oder diesen entsprechenden Aminosäuren aus einem anderen BMP-2-ähnlichen Protein durch andere Aminosäuren substituiert sind:

V33, A34, P35, P36, G37, Y38, H39, F41, Y42, T82, E83, L84, S85, A86, I87, S88, L90, K97, V98, V99, L100, V107, E109 und G110.

Die folgende Tabelle II gibt einen Überblick über bevorzugte Ersatzaminosäuren für die genannten Aminosäurereste:

Tabelle II

Aminosäurereste (BMP-2)	Ersatzaminosäuren	Bevorzugte Ersatzaminosäuren
V33	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
A34	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W	D, E, R, Q, Y
P35	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
P36	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
G37	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W	D, R, Q, Y
Y38	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
H39	D, E, Q, N, Y, F, W, G, A, S	E, D, Q, Y, A
F41	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	E, R, Q, A
Y42	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
T82	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W, A	D, R, Q, Y, A
E83	R, K, H, Q, N, Y, F, W, G, A, S	R, N, Y, G, S
L84	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
S85	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W	E, R, Q, Y
A86	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W	D, R, Q, G
I87	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
S88	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W, A, G	D, R, Q, A, G
L90	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
K97	D, E, Q, N, Y, F, W, G, A, S	D, Q, Y, A
V98	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
V99	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
L100	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
V107	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
E109	Y, F, W, T, Q, N, G, A, S	Y, W, Q, A
G110	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W, A, S	D, R, Q, Y

Aus der Literatur ist bekannt, dass die verschiedenen Mitglieder der BMP-Subfamilien 2 und 5 sowie der GDF-Subfamilie 5, auch wenn insgesamt eine relativ niedrige Homologie zwischen diesen Proteinen besteht, eine gleiche Anordnung der für die Tertiärstruktur entscheidenden Cysteine aufweisen. Dementsprechend lassen sich unter Berücksichtigung dieser konservierten Positionen die einer bestimmten Aminosäure in BMP-2 entsprechenden Aminosäurepositionen bei den anderen Mitgliedern der genannten Subfamilien bestimmen. So entspricht beispielsweise die BMP-2-Position V33 in BMP-7 einem Isoleucin, A34 ist ebenfalls Alanin, P35 ein Prolin, P36 ein Glutamat, H39 ein Alanin, S88 ein Serin, L90 ein Leucin, V98 ein Valin, L100 ein Leucin und E109 ein Arginin. Figur 6 zeigt eine mit dem Programm „Multalin“ durchgeführtes Alignment der Sequenzen von BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-3, GDF-1, BMP-10, GDF-2, BMP-15, GDF-9B, GDF-9, BMP-3, GDF-10, Act-A, Act-B, Act-C, BMP-11, GDF-8, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Inh-a, MIS und GDNF, aus dem die einer bestimmten BMP-2 Aminosäure entsprechenden Aminosäuren in anderen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie entnommen werden können. Die Positionen, die durch den Vergleich mit BMP-2 ermittelt werden, können ebenfalls durch Substitution, Deletion oder chemische Modifikation verändert werden. Desgleichen können die Epitope durch Insertion Bindungsaffinität einbüßen, wobei Insertionen jeweils unmittelbar vor oder nach den angegebenen Positionen bevorzugt sind.

Die Veränderung der für BMP-2 genannten Positionen in Mitgliedern der Subfamilien BMP-5 und GDF-5 durch eine nicht konservative Substitution, Deletion oder chemische Modifikation führt jeweils zu Mutanten mit veränderten, und zwar in der Regel verminderten Bindungseigenschaften für BMPR-II oder für einen anderen Typ II Rezeptor.

Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf Mutante, die mindestens 50 % Identität auf der Aminosäureebene mit einem Wachstumsfaktor aus der TGF- β -Superfamilie und außerdem antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweisen. Somit sind auch Mutante umfasst, deren Aminosäuresequenz sich von der Aminosäuresequenz der entsprechenden natürlichen Proteinketten auch in Bereichen, die für eine

antagonistische bzw. partiell agonistische Aktivität nicht entscheidend sind, unterscheidet.

Der dem Fachmann bekannte Ausdruck "Identität" bezeichnet den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehr DNA-Molekülen bzw. zwei oder mehr Polypeptid-Molekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird. Der Prozentsatz der "Identität" ergibt sich aus dem Prozentsatz identischer Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten.

Die Identität miteinander verwandter Polypeptide oder DNA-Moleküle kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit den besonderen Anforderungen Rechnung tragenden Algorithmen eingesetzt. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Identität zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (12): 387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S. et al., J. Molec Biol 215:403/410 (1990)). Das BLAST X Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. 215:403/410 (1990)). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Identität verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Sequenzvergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus: Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol 48:443-453 (1970)
Vergleichsmatrix: BLOSUM62 aus Henikoff & Henikoff, PNAS USA 89 (1992), 10915 - 10919

Lückenwert (Gap Penalty): 12

Lückenlängen-Wert

(Gap Length Penalty): 2

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Standardparameter (default parameters) für Aminosäuresequenz-Vergleiche, wobei Lücken an den Enden den Homologiewert nicht verringern. Bei sehr kleinen Sequenzen im Vergleich zur Referenzsequenz kann es weiterhin notwendig sein, den Erwartungswert auf bis zu 100000 zu erhöhen und ggf. die Wortlänge (wordsizes) auf bis zu 2 zu verkleinern.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Eine mit den oben genannten Algorithmen ermittelten Übereinstimmung von 50 % wird als 50 % Identität bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Identitätsgrade.

In bevorzugten Ausführungsformen haben die erfindungsgemäßen Muteine eine Identität von 60 % oder mehr, z. B. mehr als 70 % oder 80 %, mit der Sequenz einer Kette aus reifem humanen BMP-2-ähnlichen Protein. Die Sequenz für reifes humanes BMP-2 findet sich z. B. in Celeste et al. (1990). Noch weiter bevorzugt sind Muteine mit mehr als 90, 95 oder 97 % Identität.

Wie oben erwähnt, ist im Fall von BMP-2 das Epitop, das eine niederaffine Bindung eingeht, das „Knuckle“-Epitop, während das Epitop, das eine hochaffine Bindung mit dem Rezeptor eingeht, das „Wrist“-Epitop ist. Die erfindungsgemäßen Muteine können weiterhin von einem Protein der TGF- β -/Aktivin-Familie abgeleitet sein. In diesem Fall handelt es sich jedoch überraschenderweise gezeigt, dass nicht Veränderungen im

„Knuckle“-Epitop, sondern Veränderungen im „Wrist“-Epitop zu Muteinen mit antagonistischer und/oder partiell agonistischer Aktivität führen. Dementsprechend ist in erfindungsgemäßen Muteinen, die von einem Protein der TGF- β -/Aktivin-Familie abgeleitet sind, ein oder mehrere Aminosäuren aus dem „Wrist“-Epitop verändert.

Zur TGF- β -/Aktivin-Familie gehören TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, alle Aktivine, Inhibine, BMP-11 und GDF-8. Bisher bekannte Aktivine umfassen beispielsweise Aktivin β A, Aktivin β B, Aktivin β C und Aktivin β E. Zu den Inhibinen zählen nach heutigem Kenntnisstand die Inhibine β A, β B und β C.

Auch im Fall der von der TGF- β -/Aktivin-Familie abgeleiteten Muteine sind Antagonisten oder partielle Agonisten in erster Linie durch Veränderung von Aminosäuren in den oberflächenexponierten Bereichen, d. h. denjenigen Bereichen, die an der Bindung an den Rezeptor beteiligt sind, erhältlich. Dabei handelt es sich im wesentlichen um die Helix vor der Faltblattstruktur β 1, die Faltblattstruktur β 1, die lange Schleife zwischen den Faltblattstrukturen β 2 und β 3, die Schlaufe vor der Helix α 3, die Helix α 3 sowie die Faltblattstruktur β 8. Wie zuvor für die BMP-2-ähnlichen Proteine beschrieben, können solche Veränderungen durch Deletionen, Substitutionen oder Modifikationen herbeigeführt werden, sowie durch die Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren. Die oben im Zusammenhang mit dem BMP-2-ähnlichen Proteinen gegebenen Möglichkeiten sind hier entsprechend realisierbar.

In bevorzugten Ausführungsformen wird mindestens eine der folgenden Aminosäuren verändert, d. h. deletiert, substituiert und/oder modifiziert und/oder ein oder mehrere Aminosäuren insertiert, wobei sich die Positionsangaben auf BMP-2 beziehen:

K5, S13, V26, G27, W28, N29, D30, W31, P48, F49, P50, A52, D53, H54, N59, I62, V63, L66, N68, S69, V70, K101, Y103.

Wie der Figur 6 entnommen werden kann, entsprechen diese Positionsangaben im TGF- β 1:

Y6, N14, L28, G29, W30, K31, fehlt, W32, P49, Y50, I51, S53, fehlt, fehlt, Q57, K60, V61, L64, N66, Q67, H68, E99, L101.

Die 3-dimensionale Struktur des Komplexes zwischen BMP-2 und den Typ I Rezeptor BMPR-IA (Kirsch, et al.; 2000 (c)) zeigt, dass diese Reste wesentlich am Rezeptorkontakt beteiligt sind.

Die erfindungsgemäßen Muteine können auch dann, wenn sie von TGF- β -/Aktivin-ähnlichen Wachstumsfaktoren abgeleitet sind, zusätzlich in den für die Bindung an den Rezeptor nicht essentiellen Regionen verändert sein. Muteine mit einer Identität von mindestens 50 % mit einer Kette eines TGF- β -/Aktivin-ähnlichen Wachstumsfaktors mit einer antagonistischen und/oder partiell agonistischen Aktivität sind ebenfalls umfasst. Solche Muteine können z. B. auch aus anderen Säugern stammen, beispielsweise Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Rind, Schwein oder Schaf. Solange solche Muteine im C2C12 Zelltest eine antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweisen, sind sie ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Bevorzugt sind Muteine mit einer Identität von 60 % oder mehr, z. B. mehr als 70 % oder 80 % Identität mit einer Kette eines Muteins aus der TGF- β -/Aktivinfamilie. Noch mehr bevorzugt sind Muteine mit mehr als 90, 95 oder 97 % Identität.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, erfindungsgemäße Muteine durch größere Veränderungen der zugrundeliegenden Moleküle zu erzeugen, z. B. indem neben einer Substitution eine Insertion eingeführt wird. Denkbare Muteine beider Subfamilien der TGF- β Superfamilie enthalten auch zusätzlich zu einer Deletion eine Insertion, oder zusätzlich zu einer Substitution eine Deletion, oder mindestens eine Substitution, Deletion oder Insertion in Verbindung mit einer chemischen Modifikation. Selbstverständlich können auch 2 Veränderungen eines Typs, z. B. eine Substitution an zwei verschiedenen Stellen, allein oder in Kombination mit Veränderung eines zweiten Typs, z. B. einer Insertion an einer anderen Stelle, auftreten. Ebenso können mehr als 2 Typen von Veränderungen kombiniert werden, also z. B. kann neben einer Substitution sowohl eine Deletion an einer Stelle als auch eine Insertion an einer anderen Stelle vorliegen.

Der Fachmann weiß, wie er die Muteine herzustellen hat. Neben einer herkömmlichen Proteinsynthese, z. B. der Merrifield-Synthese, bieten sich für die Substitution, Deletion und Insertion vor allem rekombinante Verfahren an. Auf der Grundlage der bekannten Gene können gezielt Mutationen eingefügt werden, z. B. durch die oligonukleotidabhängige stellenspezifische Mutagenese. Es können Fragmente deletiert oder eingesetzt werden. Alternativ können für die Muteine kodierende DNA-Sequenzen *de novo* synthetisiert werden.

Chemische Modifikationen werden ebenfalls in dem Fachmann bekannter Weise eingeführt. Die Durchführung chemischer Modifikationen an Proteinketten ist z. B. beschrieben in DeSantis & Jones (1999).

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist das zuvor beschriebene Mutein mit einem zielspezifischen Molekül kovalent verbunden. Dies kann z.B. ein Heparin-bindendes Epitop sein, das eine verstärkte Bindung an die Glycosaminoglycane der extrazellulären Matrix oder der Zelloberfläche bewirkt (s. z. B. PCT/EP00/00637). Unter der Maßgabe, dass dieses zielspezifische Molekül ein Antikörper ist, kann so z.B. gezielt die Signaltransduktion in solchen Zellen unterbunden werden, die ein Oberflächenprotein aufweisen, das von dem Antikörper erkannt wird. Zielspezifität kann dem Mutein jedoch nicht nur durch kovalente Bindung an einen Antikörper verliehen werden, sondern gegebenenfalls ebenso durch kovalente Bindung an einen Liganden, der für einen nur auf der Zielzelle vorkommenden Rezeptor spezifisch ist.

In bevorzugten Ausführungsformen werden Muteine mit kovalent daran gebundenem zielspezifischen Molekül durch rekombinante Expression eines Fusionsproteins, das gegebenenfalls einen Spacer zwischen Mutein-kodierender Sequenz und zielspezifischen Molekül enthält, hergestellt.

Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf Derivate von Proteinen aus der TGF- β Superfamilie, die als essentiellen Bestandteil ein Mutein gemäß der vorliegenden Erfindung sowie zur Bildung eines Dimers eine weitere Kette eines Proteins aus der Gruppe der TGF- β Superfamilie oder ein weiteres erfindungsgemäßes Mutein enthalten. Die Derivate können daher sowohl Homodimere als auch Heterodimere aus

erfindungsgemäßen Muteinen bilden. Darüber hinaus kann ein Derivat ein Mutein und eine natürliche Kette eines Proteins aus der TGF- β -Super-Familie umfassen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das Derivat ein Heterodimer bestehend aus einem Mutein mit wenigstens einer Mutation im „wrist“-Epitop und einer natürlichen Kette eines Proteins aus der TGF-beta-Super-Familie. Besonders bevorzugt ist die natürliche Kette des Heterodimers BMP-2. Ferner besonders bevorzugt ist das Mutein des Heterodimers BMP-2 mit der Doppelsubstitution F49A und P50A. Insbesondere bevorzugt besteht das Heterodimer aus BMP-2 und einem BMP-2 Mutein mit der Doppelsubstitution F49A und P50A.

Experimentell wurde durch Induktion der ALP-Aktivität in C2C12-Zellen gefunden, dass ein Heterodimer, bestehend aus einem Mutein mit wenigstens einer Mutation im „wrist“-Epitop und einer natürlichen Kette eines Proteins aus der TGF-beta-Super-Familie, als partieller Agonist wirkt (vgl. Beispiel 8). Das Heterodimer weist im Vergleich zu einem Homodimer, das aus zwei natürlichen Ketten besteht, eine um ca 75 % verringerte biologische Aktivität auf.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Derivat ein Heterodimer, das aus einem Mutein mit wenigstens einer Mutation im „knuckle“-Epitop und einer natürlichen Kette eines Proteins aus der TGF-beta-Super-Familie besteht. Besonders bevorzugt ist die natürliche Kette des Heterodimers BMP-2. Ferner besonders bevorzugt ist das Mutein des Heterodimers BMP-2 mit der Doppelsubstitution A34D und D53A. Insbesondere bevorzugt besteht das Heterodimer aus BMP-2 und einem BMP-2 Mutein mit der Doppelsubstitution A34D und D53A.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass ein Heterodimer, bestehend aus einem Mutein mit wenigstens einer Mutation im „knuckle“-Epitop und einer natürlichen Kette eines Proteins aus der TGF-beta-Super-Familie, als vollständiger hochaffiner Antagonist wirkt, wie durch die Inhibition der Induktion der ALP-Aktivität in C2C12-Zellen bestimmt wurde (vgl. Beispiel 9). Das Heterodimer weist in Abwesenheit eines Agonisten keine eigene ALP-induzierende Aktivität auf (vgl. Beispiel 8).

Ein solches Heterodimer sollte aufgrund der Mutation eines Monomers nur ein intaktes „knuckle“-Epitop aufweisen, welches eine verringerte, jedoch vorhandene ALP-Aktivität gegenüber einem aus zwei natürlichen Ketten bestehenden Homodimer erwarten ließe. Das verbleibende „knuckle“-Epitop im Heterodimer ist jedoch offensichtlich nicht in der Lage, den Verlust des anderen Epitopes zu kompensieren, so dass das Heterodimer als vollständiger Antagonist wirkt. Weiterhin vorteilhaft ist hierbei die Tatsache, dass der Antagonist hochaffin ist und somit bereits in niedriger Konzentration effektiv den natürlichen Liganden vom Rezeptor verdrängt. Die Effizienz bei niedriger Konzentration macht das Heterodimer insbesondere für den therapeutischen Einsatz interessant.

Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf pharmazeutische Zusammensetzungen, die mindestens ein erfindungsgemäßes Protein und/oder ein erfindungsgemäßes Derivat enthalten. Umfasst von der Erfindung sind weiterhin pharmazeutisch verträgliche Salze davon. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in Abhängigkeit von der Natur des darin enthaltenden Muteins und in Abhängigkeit von dem zu behandelnden pathologischen Zustand in Form von Salben, Cremes, Lotionen für die topische Applikation vorgesehen sein, in Form von Lösungen oder Lyophilisaten für intramuskuläre oder subkutane Injektionen. Die Formulierung und Konfektionierung der pharmazeutischen Zusammensetzungen erfolgt dabei nach Stand der Technik bekannten Maßgaben und umfasst u. a. die Stabilisierung.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist die Verwendung eines erfindungsgemäßigen Muteins und/oder eines erfindungsgemäßigen Derivates zum Herstellen pharmazeutischer Zusammensetzungen beansprucht. Diese können zur Prophylaxe und/oder zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden, die durch ein Protein aus der Superfamilie des TGF- β -Wachstumsfaktors vermittelt werden. Beispiele solcher Erkrankungen sind ektopische Knochenbildungen, Psoriasis und Muskelschwund, Narbenbildung, Fibrosen und Zirrhosen. Dabei wird im Fall von ektopischer Knochenbildung bevorzugt ein Mutein einer der Wachstumsfaktoren BMP-2 oder BMP-4 eingesetzt, während z. B. im Fall von Leberzirrhose bevorzugt ein Mutein eines oder mehrerer der Wachstumsfaktoren TGF- β 1, - β 2 oder - β 3 bzw. ein diese enthaltendes Derivat verwendet wird.

In weiteren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Mutein oder ein erfindungsgemäßes Derivat bereitgestellt. Da die Muteine sich durch eine Veränderung an oberflächenexponierten Bereichen des Moleküls auszeichnen, wirkt sich dies auch auf die spezifisch mit dem Molekül reagierenden Antikörperpopulationen aus. Antikörper können auf herkömmliche Art und Weise entweder durch Immunisieren von Tieren (z. B. Kaninchen, Mäusen oder Ratten) zur Herstellung polyklonaler Antikörper bzw. durch Immunisieren und nachfolgendes Immortalisieren von Antikörper produzierenden Zellen im Fall von monoklonalen Antikörpern hergestellt werden. Die dafür erforderlichen Verfahren sind dem Fachmann mittlerweile bestens vertraut, jedoch muß wegen der hohen phylogenetischen Invarianz der Superfamilie darauf geachtet werden, für die Antikörpererzeugung möglichst einen Wirt zu wählen, dessen Wachstumsfaktoren sich von dem, gegen den Antikörper erzeugt werden sollen, weitgehend unterscheiden.

Die Erfindung betrifft weiterhin die für die erfindungsgemäßigen Muteine kodierenden Nukleinsäuren. Diese enthalten eine Nukleinsäuresequenz, die für ein gewünschtes Mutein kodiert. Die Nukleinsäuresequenz für BMP-2 ist z. B. aus Wozney et al. (1988) bekannt, die für TGF- β 2 aus Madisen et al. (1988). Die für ein Mutein kodierende Nukleinsäuresequenz unterscheidet sich davon primär durch die für die veränderten Aminosäuren kodierenden Triplets, d. h. durch das Fehlen, den Austausch oder die Insertion von einem oder mehreren Codons. Soweit das Mutein ein Mutein mit einer Identität von 50 % oder mehr auf Aminosäureebene ist, haben die entsprechenden Nukleinsäuren ebenfalls eine im Vergleich zur zugrunde gelegten Nukleinsäuresequenz für eine natürliche reife Proteinkette verminderte Identität. Von dieser wegen der Degeneration des genetischen Codes abweichende Nukleinsäuren sind ebenfalls umfasst. Weiterhin sind zu den für die Muteine kodieren Nukleinsäuresequenzen komplementäre Sequenzen sowie mit diesen komplementären Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleinsäuren, die für ein Mutein kodieren, das nach Bildung eines Homodimers antagonistisch oder partiell agonistische BMP-2 Aktivität aufweist, umfasst. Stringente Bedingungen sind dabei beispielsweise eine Hybridisierung bei 68° C in 0,5 x SSC. Diese und weitere stringente Hybridisierungsbedingungen können im Handbuch von Maniatis et al., 1989, nachgesehen werden.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann eine genomische DNA, eine cDNA, eine synthetische DNA oder eine RNA sein. Genomische DNAs oder cDNAs können nach im Stand der Technik bekannten Verfahren aus den entsprechenden gDNA- oder cDNA-Banken isoliert werden. Bei der Isolierung von Nukleinsäuren aus cDNA-Banken sind gewebe- oder zelllinienspezifische Banken, z. B. aus U-2 OS-Osteosarkom-Banken oder Prostata-Adenocarcinoma-Banken, bevorzugt. Synthetische DNA kann nach bekannten Verfahren hergestellt werden, RNA entweder mittels RNA-Vektoren oder aus mRNA isoliert werden. Für die rekombinante Produktion von erfindungsgemäßen Mutanten wird man je nach Expressionssystem eine genomische DNA oder cDNA bevorzugen, wobei jedoch die Expression mittels RNA-Vektoren nicht ausgeschlossen ist.

Im Fall von Substitutionsveränderungen kann durch im Stand der Technik bekannte Verfahren das für die ursprüngliche Aminosäure kodierende Codon ersetzt werden. Im Fall von Deletionen werden für ein oder mehrere Aminosäure kodierende Codons entfernt, während im Fall von Insertionen Codontriplets, die für die gewünschten Aminosäuren kodieren, eingesetzt werden. Bei der Auswahl von Codons im Falle einer Substitution oder Insertion wird sich der Fachmann bemühen, dem Codongebrauch des vorgesehenen Wirtsorganismus Rechnung zu tragen. Die entsprechenden Informationen sind im Stand der Technik erhältlich.

Erfindungsgemäß werden weiterhin Nukleinsäuren zur Verfügung gestellt, die einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor enthalten, wobei die für ein erfindungsgemäßes Mutant kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle dieses Promotors steht. Die Wahl eines geeigneten Promotors ist wiederum von der Wahl des Expressionssystems abhängig. Der Fachmann hat hierbei die Wahl zwischen einer Vielzahl bekannter, induzierbarer oder konstitutiver Promotoren für die verschiedensten Wirtsorganismen.

Zur rekombinanten Expression der erfindungsgemäßes Nukleinsäure wird diese bevorzugt in einen Vektor eingesetzt. Die Erfindung betrifft weiterhin einen Vektor, der eine erfindungsgemäßes Nukleinsäure enthält, sowie Wirtsorganismen, die eine

Nukleinsäuresequenz, die für ein Mutein kodiert, entweder direkt in das Genom integriert oder aber in Form eines autonom replizierenden Vektors enthält. Im Stand der Technik sind zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt, wobei die Wirtszellen beispielsweise ausgewählt sind aus prokaryontischen Zellen, z. B. Bakterien wie *E. coli* oder *B. subtilis*, aus eukaryontischen Zellen, wie Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen, z. B. CHO-Zellen, COS-Zellen oder HeLa-Zellen, sowie Derivaten davon. Im Stand der Technik sind beispielsweise bestimmte CHO-Produktionslinien bekannt, deren Glykosylierungsmuster im Vergleich zu CHO-Zellen verändert sind. Die durch die Verwendung glykosylierungseffizienter oder glykosylierungsverringerter Wirtszellen erhaltenen Polypeptide verfügen über eine veränderte räumliche Struktur, die möglicherweise mit einer veränderten biologischen Aktivität einhergeht.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zum Herstellen eines erfindungsgemäßen Muteines, wobei das Verfahren die Kultivierung einer Wirtszelle unter der zur Expression geeigneten Bedingungen und ggf. das Aufreinigen des exprimierten Muteins nach im Stand der Technik bekannten Verfahren umfasst.

Die folgenden Beispiele und die Figuren erläutern die Erfindung, ohne sie darauf einzuschränken.

Figurenbeschreibungen

Figur 1:

Figur 1 zeigt die Sequenzen für BMP-2, BMP-7, TGF- β 2 und TGF- β 3, wobei entsprechende Aminosäuren untereinander angeordnet sind. Über der BMP-2 Sequenz sind die durch Substitution veränderten Aminosäurereste angegeben. BMP-2 Muteine mit verringriger Bindungsaffinität für den Typ II Rezeptor BMPR-II sind in durch einen doppelten vertikalen Strich kenntlich gemacht. Veränderte Bindungsaffinitäten für den Typ I Rezeptor BMPR-IA, die auf einer erniedrigten Assoziations- oder einer erhöhten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante beruhen, sind mit einem Plus (+) bzw. Kreuz (x) an den entsprechenden Positionen gekennzeichnet. Einfache vertikale Striche weisen

darauf hin, dass keine meßbaren Änderungen der Funktion der entsprechenden Muteine gefunden werden konnten

Die Nummerierung bezieht sich auf die BMP-2 Sequenz.

Figur 2:

Figur 2 gibt Aufschluß über die biologische Aktivität und die inhibitorischen Eigenschaften von BMP-2 Muteinen.

(A) Nach Inkubation von BMP-2 oder einem BMP-2 Mutein (250 nM) wurde die alkalische Phosphataseaktivität gemessen. Die von jedem Mutein hervorgerufene Antwort wurde in % der BMP-2 Antwort ausgedrückt. Die Werte stellen die Mittelwerte (+/- Standardabweichung) von 4 Messungen dar.

Muteine mit gefüllten Symbolen sind hinsichtlich ihrer BMPR-II Wechselwirkung verändert, wie in Figur 4 gezeigt. Plus- oder Kreuz-Symbole weisen auf Muteine mit einer veränderten Assoziations- oder Dissoziationskonstante für die Bindung an die BMPR-IA Rezeptorkette hin.

(B) Die dosisabhängige Induktion der Aktivität der alkalischen Phosphatase in ausgehungerten C2C12 Zellen ist für BMP-2 (o) und für die BMP-2 Muteine A34D (Ø), D30K (□) und P50A (Δ) gezeigt. Die Hintergrundabsorption bei 405 nm von 0,080 +/- 0,020 wurde nicht abgezogen, um das Signal/Hintergrundverhältnis darzustellen.

(C) Die Inhibition der Induktion der alkalischen Phosphataseaktivität in ausgehungerten C2C12 Zellen wurde nach Inkubation mit 250 nM BMP-2 Mutein in Gegenwart von 10 nM (o) oder 20 nM (Δ) BMP-2 bestimmt. Die in Gegenwart von BMP-2 allein erhaltene Antwort ist durch eine gepunktete Linie angezeigt und wurde als 100 % angesetzt. Die Werte stellen einen Mittelwert +/- Standardabweichung von 4 Messungen dar.

Muteine mit gefüllten Symbolen sind hinsichtlich ihrer BMPR-II Wechselwirkung verändert. Plus- oder Kreuz-Symbole weisen auf Muteine mit veränderten

Assoziations- oder Dissoziationskonstanten für die Bindung an den BMPR-IA Rezeptor hin.

(D) Die Inhibition der BMP-2 Aktivität (10 nM BMP-2) durch zunehmende Dosen möglicherweise antagonistischer (partiell agonistischer) BMP-2 Muteine in ausgehungerten C2C12 Zellen. Die Dosiswirkungskurven der Muteine A34D (o) H39D (□) S88A (Δ), L90A (▽) und L100A (◊) in Gegenwart von 10 nM BMP-2 wurden nach Inkubation der Zellen (3 Tage) und Analyse der induzierten alkalischen Phosphataseaktivität erhalten.

Figur 3:

Figur 3 zeigt die Biosensoranalyse der Bindung von BMP-2 und BMP-2 Muteinen an (A) Typ I oder (B) Typ II BMP-Rezeptorketten.

Figur 4:

Figur 4 zeigt die Wechselwirkung von BMP-2 Muteinen mit Typ I (BMPR-IA)- oder Typ II (BMPR-II, ActR-II)-Rezeptorektodomänen.

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) eines BMP-2 Muteins bei einer Konzentration von 15, 30 und 45 nM mit immobilisierter BMPR-IA Rezeptorektodomäne wurde aus den in Figur 3 (A) gezeigten Sensogrammen abgeleitet. Die in Figur 3 (B) gezeigten Sensogramme wurden ausgewertet, um die Gleichgewichtsbindung von 45 nM Mutein (EQ45) an immobilisierte BMPR-II-oder ActR-II-Rezeptorektodomänen abzuleiten. Alle Werte wurden normalisiert, in dem die k_{on} , k_{off} und EQ45 Werte von BMP-2 als Standard genommen wurden.

(A) Gleichgewichtsbindung von zunehmenden Konzentrationen von BMP-2 an die Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB sowie an die Typ II Rezeptoren BMPR-II und ActR-II. Für die Bestimmung der Gleichgewichtsbindung an die immobilisierten Rezeptordomänen wurden die in Figur 3 gezeigten Sensogramme ausgewertet.

(B) Differentielle Bindungsaffinität von BMP-2 Muteinen an BMPR-II oder ActR-II Rezeptoren. Die Gleichgewichtsbindung während der Biosensoranalyse von 45 nM

Mutein (EQ45) an BMPR-II ist gegen die Bindung an ActR-II aufgetragen. Die Werte sind durch die Gleichgewichtsbindung von BMP-2 an die entsprechenden Rezeptoren normalisiert.

(C) Graphische Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) eines BMP-2 Muteines mit dem BMPR-IA Rezeptor. Muteine, die spezifisch hinsichtlich ihrer k_{on} verändert sind, sind durch Plus-Symbole gekennzeichnet, solche mit spezifisch veränderter k_{off} durch Kreuz-Symbole.

(D) Graphische Darstellung der Assoziationskonstanten (k_{on}) für die BMPR-IA Bindung und die Gleichgewichtsbindung (EQ45) an BMPR-II für die gleichen Muteine wie in (C). Weil sowohl die Assoziationskonstanten als auch die Gleichgewichtsbindung von der Konzentration des BMP-2 Muteins abhängen, werden spezifische (und konzentrationsunabhängige) Veränderungen sichtbar. Muteine mit einer spezifischen Abnahme des Bindungsgleichgewichts sind durch gefüllte Kreise markiert.

Figur 5:

Figur 5 ist ein Raummodell von BMP-2 (Scheufler et al., 1999), in dem die die Typ-I Rezeptorbindung bestimmenden Reste des „wrist“-Epitops und die die Typ-II Rezeptorbindung bestimmenden Reste des „knuckle“-Epitops bezeichnet sind. Die Zuordnung ergibt sich aus Figur 1, sowie aus den Tabellen und Auflistungen auf den Seiten 12/13 und 17. Reste der einen Untereinheit sind dick und kursiv beschriftet, Reste der anderen mit einfachen Großbuchstaben.

Auf der kleinen inserierten Schemazeichnung ist das dimere Protein in der Papierebene um die lange Achse um 90 Grad gedreht.

Figur 6

Sequenzzuordnung von Faktoren der TGF- β Superfamilie. Die Nummerierung folgt der Aminosäure-Sequenz des reifen humanen BMP-2.

Figur 7

Figur 7 zeigt die Dosis-abhängige Induktion der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP-Aktivität) in C2C12-Zellen durch BMP-2 Muteine.

- A) Homo- und Heterodimere BMP-2 Proteine mit verschiedenen N-terminalen Sequenzen zeigen eine ähnlich Dosis-Antwort in C2C12-Zellen. Die ALP-Aktivitätswerte wurden bestimmt nach Subtraktion des Hintergrundes (ca. 70 willkürliche ALP-Einheiten) und in Bezug zur Maximal-Antwort von 100 % (ca. 2300 willkürliche ALP-Einheiten) gesetzt.
- B) Homo- und Heterodimere BMP-2 Muteine, die in dem hochaffinen Epitop I (B2el/B2el und B2el/B2m-) oder dem niedrig-affinen Epitop II (B2ell/B2ell und B2ell/B2m-) verändert waren, wurden mit C2C12-Zellen inkubiert und die ALP-Induktion Dosis-abhängig gemessen.
- C) ALP-Aktivität, die durch BMP-2 Muteine in C2C12-Zellen induziert wurde. Die ALP-Induktion wurde bei Vorhandensein von 250 nM BMP-Protein (ALP250) bestimmt. Die Werte zeigen einen Mittelwert von 12 Messungen +/- Standardabweichung (SD). Die Antwort bei Vorhandensein von Medium alleine wurde als Kontrollwert bestimmt.

Figur 8

Figur 8 zeigt die antagonistische Aktivität des Heterodimers B2ell-/B2m-, das Mutationen im „knuckle“-Epitop trägt. Das Heterodimer B2ell-/B2m- ist ein vollständiger hochaffiner Antagonist in Bezug auf die Induktion der ALP-Aktivität.

Die Dosis-abhängige Inhibition von 10 nM bzw. 20 nM BMP-2/B2m- durch das Heterodimer B2ell-/B2m- ist mit der Dosis-Antwortkurve für BMP-2/B2m- verglichen. Die ALP-Aktivitätswerte wurden nach Subtraktion des Hintergrundes bestimmt und in Bezug zur Maximalantwort von 100 % gesetzt.

BEISPIELE

Material und Methoden

Herstellung rekombinanter Rezeptor-Ektodomänen

Eine extrazelluläre Domäne des humanen BMPR-IA, umfassend die Reste 24-142 (ten Dijke et al., 1993) einschließlich einer N-terminalen Verlängerung (GSGAMA) wurde als lösliches Thioredoxin-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert. Nach Thrombinspaltung wurde das Protein mittels Affinitätschromatographie über BMP-2 Sepharose gereinigt, wie von Kirsch et al., (2000 (a)) beschrieben.

Die extrazellulären Domänen von ActR-II (Aminosäurereste 19-126) (Matzuk und Bradley, 1992), BMPR-II (Aminosäurereste 27-151) (Rosenzweig et al., 1995) und BMPR-IB (Aminosäurereste 14-126) (Astrom et al., 1999) wurden mit einer C-terminalen Thrombinspaltstelle (LVPRGS) zusammen mit einem 6xHis-tag in SF-9 Insektenzellen Pharmingen im Einklang mit den Instruktionen des Herstellers exprimiert. Die korrespondierenden DNA-Sequenzen wurden in die BamHI-Spaltstelle des Baculovirus Transfervektors pAcGP67B (Pharmingen) insertiert. Das Kulturmedium, das nach Infektion der SF9-Zellen mit einer MOI (multiplicity of infection) von 3 vier Tage lange inkubiert worden war, wurde auf Ni-NTA-Agarose Qiagen in einem Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,3, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) bei 4°C aufgetragen. Die rekombinanten Proteine wurden mit Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,3, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol) eluiert und gründlich gegen Hochsalz HBS-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 500 mM NaCl, 3,4 mM EDTA) dialysiert. Schließlich wurden die Ektodomänen an eine BMP-2-Sepharose-Affinitätsmatrix adsorbiert (Kirsch et al., 2000(a)) gewaschen und mit 4 M MgCl₂ eluiert. Die gereinigten Proteine wurden in Niedrigsalz HBS-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA) überführt, mittels YM 10 Ultrafiltrationsmembranen konzentriert und bei -80°C gelagert.

Die gereinigten Rezeptorproteine wurden durch Inkubation mit äquimolaren Konzentrationen von Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) wie beschrieben N-biotinyliert (Shen et al., 1996).

Herstellung von BMP-2-Muteinen

Eine BMP-2 cDNA, die für die Reste 283-396 des reifen BMP-2-Proteins plus der beiden N-terminalen Aminosäuren MA kodiert (Ruppert et al., 1996), wurde einer in vitro Kassetten-Mutagenese (Wang et al., 1997) unterworfen, wofür synthetische doppelsträngige Oligonukleotide verwendet wurden. Die BMP-2-Muteine wurden in *E. coli* exprimiert, als Einschlußkörper isoliert, renaturiert und wie in Ruppert et al., s.o., beschrieben, gereinigt.

Herstellung von BMP-2-Heterodimeren

Nachfolgend bezeichnet B2m- ein BMP-2 Molekül mit einem veränderten N-terminalen Segment (als EHBMP-2 in Ruppert et al., 1996 bezeichnet). Das Heterodimer B2el-/B2m- besteht aus einem Monomer B2m- und einem BMP-2 Mutein mit den Aminosäuresubstitutionen F49A und P50A, die im wrist-Epitop liegen. Das Homodimer B2el-/B2el- ist das entsprechende Homodimer, das in zwei wrist-Epitopen defizient ist. Das Heterodimer B2ell-/B2m- besteht aus einem Monomer B2m- und einem BMP-2 Mutein, das die Aminosäuresubstitutionen A34D und D53A aufweist. Diese Aminosäuresubstitutionen betreffen das „knuckle“-Epitop. Das Homodimer B2ell-/B2ell- stellt das entsprechende Homodimer dar, das die Mutationen in beiden Monomeren des BMP-Moleküls aufweist.

Zur Herstellung der Heterodimeren wurden equimolare Konzentrationen der beiden unterschiedlichen Monomere in einem Renaturierungsgemisch gefaltet. Jeweils eines der Proteine war dabei eine B2m- Variante, die eine veränderte N-terminale Sequenz ohne ein Heparinbindungsepitop enthält. Auf Grund eines geringeren Gehaltes an positiv geladenen Seitenketten eluieren die Varianten, die ein B2m- Monomer enthalten, im Vergleich zu BMP-2 Homodimeren bei niedrigeren Salzkonzentrationen während der Kationen-Austauscher-Chromatographie. Als Kationen-Austauscher-Material ist hierbei SP-Sepharose [®] geeignet.

C2C12[alkalischer Phosphatase(ALP)]-Test

Die Promyoblastenzellen C2C12 (ATCC CRL-1772, Blau et al., 1983) wurden in einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro Napf in einer Mikrotiterplatte mit 96 Näpfen 3 Tage lang mit 1 bis 250 nM jeder BMP-2-Variante in 100 μ l DMEM-Medium mit 2% Kälberserum und Antibiotika (100 U/ml Penicillin G und 100 μ g/ml Streptomycin) bei 37°C in angefeuchteter Atmosphäre bei 5% CO₂ stimuliert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann 1 Stunde mit 100 μ l 1% NP40 in ALP-Puffer (0,1 M Glycin, pH 9,6, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂) lysiert. Die ALP-Aktivität wurde bestimmt, indem die lysierten Zellen 15 Minuten mit 100 μ l ALP-Puffer plus 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat inkubiert wurden und die Extinktion bei 405 nm gemessen wurde. Eine A₄₀₅-Extinktionseinheit entspricht 1,5 nmol p-Nitrophenolatproduktion pro Minute pro 3×10^4 Zellen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte, die in vier unabhängigen Experimenten gewonnen worden waren, mit einer Standardabweichung (SD) von +/- 39% ausgedrückt. Inhibitionsexperimente, die in Gegenwart von 10 oder 20 nM BMP-2 durchgeführt worden waren, zeigten größere Standardabweichungen, die in den entsprechenden Figuren gezeigt sind.

Biosensor-Interaktionsanalyse

Das BIA2000-System (Biacore) wurde verwendet, um die Bindung von BMP-2-Muteine an immobilisierte Rezeptor-Ektodomänen aufzuzeichnen. Die biotinylierten Proteine wurden getrennt an eine Streptavidin-beschichtete Matrix von Biosensor CM5 in Flußzellen 2, 3 und 4 bei einer Dichte von ungefähr 200 Resonanzeneinheiten (RU) fixiert, was 200 pg Protein (ungefähr 15 fmol-Rezeptor) pro mm² entspricht. BMP-2-Muteine wurden in Konzentrationen von 15 bis 30 nM in HBS-Puffer (10 mM Hepes, pH 7,4, 500 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,005% P20 (Biacore) über die Flußzellen 1, 2, 3 und 4 in Reihe bei einer Flußrate von 10 μ l/min bei 25°C perfundiert, und die Sensogramme wurden bei einer "data sampling rate" von 2,5 Hz aufgenommen. Der Assoziationszeitraum betrug 20 Minuten und der Dissoziationszeitraum war auf 6 Minuten eingestellt. Freie Rezeptoren wurden durch Perfusion mit 0,1 M Essigsäure, 1 M NaCl für 2 Minuten regeneriert. Das Basissensogramm, das für die Flußzelle 1 (Streptavidin-Kontrolle) aufgezeichnet worden war, wurde von den Sensogrammen, die

für die Flußzellen 2 (BMPR-II), 3 (ActR-II) und 4 (BMPR-IA) erhalten wurden, subtrahiert. Die differentiellen Sensogramme wurden im Einklang mit der "fitting routine 2" gemäß der BIA-Auswertungs-Software 2.2.4 (Biacore) ausgewertet. Die Gleichgewichtsbindung von BMP-2-Muteinen bei einer Konzentration von 45 nM (EQ₄₅) wurde zweimal doppelt mit einer maximalen Standardabweichung (SD) von +/- 20% gemessen. Die angegebenen Geschwindigkeitskonstanten k_{on} für die Assoziationsgeschwindigkeit und k_{off} für die Dissoziationsgeschwindigkeit für die Interaktion zwischen BMPR-IA und BMP-2-Muteinen sind Mittelwerte, die in mindestens 12 Messungen gewonnen worden sind, die mit mindestens drei verschiedenen Konzentrationen der Liganden durchgeführt worden waren. Die Standardabweichungen betrugen 13% für k_{on} und 19% für k_{off} . Weil die wirkliche Stöchiometrie der Komplexbildung noch nicht sicher ist, wurden alle Sensogramme auf der Grundlage eines nicht gesicherten 1:1 Assoziationsmodells ausgewertet, und daher werden nur apparente, aber keine absoluten Konstanten angegeben.

Beispiel 1: Auswahl von BMP-2 Muteinen

Um funktionell wichtige Aminosäureseitenketten und Rezeptor-bindende Epitope im reifen Anteil von humanem BMP-2 zu identifizieren, wurden 57 Aminosäurereste einzeln durch *in vitro* Mutagenese substituiert (Kirsch et al., 2000 (b)). Die substituierten Reste sind in Figur 1 über der BMP-2 Sequenz wiedergegeben. Die Muteine wurden in *E. coli* exprimiert. Es wurde ein Satz von 42 Muteinen erhalten, die an 40 verschiedenen Positionen substituiert waren. Die Expression in *E. coli* führte zu dimeren Proteinen, die mit einer Reinheit von besser als 95 % und in Ausbeuten, die für die anschließende Analyse der biologischen Aktivität und Rezeptorbindung ausreichend waren, erhalten werden konnten.

In einer ersten Mutageneserunde wurden 20 Reste mit an der Oberfläche des Moleküls exponierten Seitenketten ausgewählt, die die gesamte Oberfläche des BMP-2 netzähnlich überspannen. Nachdem Muteine mit vielversprechenden Phänotypen erhalten worden waren, wurden die juxtaponierten Oberflächenreste systematisch ausgetauscht. Zunächst wurden die Reste durch Alanin ersetzt, um den Beitrag der ersetzen Seitenkette zur Bindungsenergie abschätzen zu können. Später wurden die

Aminosäurereste durch geladene Reste ersetzt, um die Änderung der phänotypischen Eigenschaften sich nach Einführen einer Ladung zu beobachten.

Beispiel 2: Biologische Aktivität von BMP-2 Muteinen

Der C2C12-Zelltest, der für die quantitative Bestimmung der biologischen Aktivität der BMP-2 Muteine verwendet worden war, erlaubt es, reproduzierbar relativ kleine Veränderungen festzustellen. Die Maus-Promyoblastenzellen differenzieren unter Hungerbedingungen sehr schnell in multinukleäre Myotuben. BMP-2 inhibiert diesen myogenen Weg und induziert die Bildung von osteoblastenähnlichen Zellen, die für alkalische Phosphatase(ALP) positiv sind. BMP-2 induziert dosisabhängig eine hohe alkalische Phosphatase(ALP)-Aktivität in hungernden C2C12-Zellen mit einer ED₅₀ von 20 +/- 10 nM (Figur 2 B). Die funktionelle Bedeutung von BMPR-IA für die osteoinduktiven Wirkungen von BMP-2 in C2C12-Zellen ist bereits bekannt. Der BMPR-IB Rezeptor wird nur in verschwindend geringen Mengen festgestellt und spielt daher in diesen Zellen wahrscheinlich keine funktionelle Rolle. Die Typ II Rezeptoren BMPR-II und ActR-II sind in C2C12-Zellen vorhanden und können mit dem BMP-2 Liganden in Abwesenheit, effizienter aber in Gegenwart von BMPR-IA quervernetzt werden. Es ist bis heute nicht eindeutig nachgewiesen, ob beide Typ II Rezeptoren die BMP-2 Antworten in Wirtszellen vermitteln. Einige BMP-2 Muteine wiesen eine eindeutig verringerte Aktivität auf, wenn sie bei einer Konzentration von 250 nM auf C2C12 Zellen untersucht wurden (Figur 2 A). Die Muteine A34D und L 90A induzieren überhaupt keine signifikante Antwort. Einige andere Mutantenproteine zeigten eine reduzierte Aktivität im Bereich von 2 % bis 30 % der BMP-2 Aktivität. Die Symbole, die die Aktivität der einzelnen Proteine bei einer Konzentration von 250 nM anzeigen, sind im Einklang mit den Ergebnissen einer Rezeptorinteraktionsanalyse (s. unten) farbig gestaltet. Rote Symbole weisen auf eine reduzierte Affinität für die BMPR-II Ektodomäne hin, während blaue Symbole eine veränderte Wechselwirkung mit der BMPR-IA Ektodomäne anzeigen.

Repräsentative Beispiele von Muteinen mit ungefähr 50 % (D30K), weniger als 10 % (P50A) und weniger als 1 % (A34D) Restaktivität sind in Figur 2 c durch

Wirkungskurven gezeigt. Weil die BMP-2 Proteine bei Konzentrationen über 500 nM im Kulturmedium präzipitierten, wurden Dosen oberhalb von 250 nM nicht analysiert.

Die Veränderungen der biologischen Aktivität der beschriebenen Muteine kann von erheblichen Veränderungen in der Struktur, Stabilität oder Solubilität des Proteins infolge von Aminosäuresubstitutionen herrühren. Alternativ können funktionelle Seitenketten, die in die Bindung des Typ I oder Typ II BMP-2 Rezeptors involviert sind, beeinträchtigt worden sein. Die letztere Möglichkeit, dass nämlich spezielle Änderungen in den Muteinen erzeugt worden sind, wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten überprüft.

Beispiel 3: Antagonistenaktivität

Überraschenderweise waren einige der Muteine in der Lage, die BMP-2 Aktivität bei Konzentration von 10 bis 250 nM zu inhibieren. Wenn C2C12-Zellen mit einer konstanten Menge BMP-2 in Gegenwart von 250 nM Mutein stimuliert wurden, wurde die Induktion der ALP-Aktivität durch das Mutein A34D auf weniger als 1 % reduziert, durch L90A auf ca. 3 %, durch L100A auf ungefähr 20 % und durch S88A auf 80 % des Wertes, der durch BMP-2 in Abwesenheit von Mutantenproteinen induziert wurde (Figur 2 c).

Die inhibitorischen Eigenschaften dieser Antagonisten/partiellen Agonisten wurde durch Bestimmung der Dosis/Inhibitionskurven bestätigt, die in Figur 2 D gezeigt sind. Die Mutantenproteine A34D, L90A und L100A inhibierten bei Konzentrationen von 20 bis 40 nM halbmaximal. Dieser IC₅₀ Wert ist einer Konzentration von 10 nM BMP-2 während des Tests ähnlich. Dementsprechend arbeiten die inhibitorischen Muteine bei ähnlichen Konzentrationen wie BMP-2, wobei sie höchstwahrscheinlich mit BMP-2 um eine gemeinsame Rezeptorbindungsstelle konkurrieren.

Der Nachweis der BMP-2 Muteinen mit antagonistischen bzw. partiell agonistischen Eigenschaften zeigt, dass durch die jeweilige Aminosäuresubstitutionen spezielle Änderungen hervorgerufen worden sind, die die Potenz des BMP-2 Proteins

beeinträchtigen, aber der Rezeptorbindungsaffinität im großen und ganzen unbeeinträchtigt lassen.

Beispiel 4: Wechselwirkung von BMP-2 Muteinen mit Rezeptorektodomänen

Es ist bereits bekannt, dass es in C2C12-Zellen Typ I BMP-2 Rezeptoren BMPR-IA und die Typ II Rezeptoren BMPR-II und ActR-II gibt, die die BMP-2 Antworten zu vermitteln scheinen. Es bestand daher die entfernte Möglichkeit, dass die funktionellen Veränderungen, die in einigen der BMP-2 Muteinen beobachtet wurden, das Ergebnis spezifischer Veränderungen in BMP-2 Epitopen für die Bindung dieser Rezeptorketten wäre. Diese Hypothese wurde im einzelnen durch eine Wechselwirkungsanalyse untersucht, in der die rekombinanten Ektodomänen von BMPR-IA, BMPR-II und ActR-II eingesetzt wurden. Es wäre schwierig gewesen, in quantitativen Radioliganden-Bindungsexperimenten die Bindung von BMP-2 Muteinen an ganzen Zellen zu untersuchen, da das BMP-2 Protein an die in der extrazellulären Matrix und auf den Zelloberflächen vorhandenen Glykosaminoglykane bindet. Die Wechselwirkung zwischen dem rekombinanten Rezeptor und den Ektodomänen konnte mittels eines Biosensorsystems aufgezeichnet werden. Es ist bereits für andere Rezeptorsysteme gezeigt worden, dass kleine Veränderungen der Bindungsaffinität oder der Kinetik der Ligandenbindung mit Biosensor-immobilisierten Rezeptordomänen gezeigt werden können. Es zeigt sich, dass die am Biosensor immobilisierten BMPR-II Rezeptorproteine sehr stabil sind und einige Dutzend Zyklen Ligandenbindung und Dissoziation ohne Veränderung der Bindungseigenschaften überleben. Die Kinetiken und die Gleichgewichtsbindung aller BMP-2 Proteine wurden daher unter den gleichen Bedingungen gemessen. Unterschiede zwischen BMP-2 und den Muteinen konnten so mit Sicherheit festgestellt werden, selbst wenn die Werte der Kinetiken und der Gleichgewichtskonstanten eher relative Werte sind.

Es wurden Sensogramme aufgezeichnet und ausgewertet, wie sie in Figur 3 gezeigt sind. Bei Verwendung immobilisierter BMPR-IA Ektodomäne konnten Unterschiede in den Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) mit den BMP-2 Muteinen leicht analysiert werden, wie in Figur 3 A für Sensogramme gezeigt ist, die alle bei einer 45 nM Konzentration der Muteine aufgezeichnet worden sind. Die

Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtsbindung von BMP-2, wie in (Figur 4 A) führt zu einer apparenten K_d von ungefähr 1 nM. Diese Affinität ist in dem Bereich einer hochaffinen Bindung, wie sie z. B. zwischen hGH und hGHbp oder IL-4 und IL-4R α beobachtet wird, und beruht hauptsächlich auf der niedrigen Dissoziationsgeschwindigkeit des Liganden (apparente $k_{off} \approx 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), was eine Halbwertszeit für den Komplex von ungefähr 0,5 Std. bedeutet. Es konnte nicht abschließend festgestellt werden, ob diese außergewöhnlich lange Halbwertszeit durch die gleichzeitige Wechselwirkung von BMP-2 mit 2 immobilisierten Rezeptoren verursacht war, oder ob es aus einer wirklichen 1 : 1 Wechselwirkung resultiert. Die Assoziationsgeschwindigkeit (apparente $k_{on} \approx 7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ist mit der anderer Rezeptoren vergleichbar. Ein Satz von Muteinen wies spezifisch erhöhte Dissoziationsgeschwindigkeiten für den Komplex mit BMPR-IA auf, wobei die K_{off} -Werte 2 bis 5-fach größer als die von BMP-2 waren (s. Figur 4 C, hellblaue Symbole). 2 Muteine mit einer Modifikation an Position D30 (D30A, D30K) und 2 Muteine an Position W31 (W31A, W31C) gehören dieser Untergruppe an. Eine andere Untergruppe mit 4 Muteinen wies erniedrigte Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation an die BMPR-IA Ektomäne mit K_{on} -Werten auf, die 5 bis 10-fach niedriger als die vom BMP-2 waren (Figur 4 C, dunkelblaue Symbole). Die erniedrigten K_{on} Werte für V26A, F49A, P50A und H54D wurden nur für BMPR-IA, aber nicht für BMPR-II oder ActR-II Wechselwirkungen beobachtet, und können daher nicht auf einer Instabilität oder Unreinheit, d. h. niedrigeren effektiven Konzentrationen dieser Muteine beruhen. Zwei Muteine, nämlich K101E und Y103A, zeigten eine 2-fache Veränderung sowohl bezüglich K_{on} als auch K_{off} . Die Kinetiken der anderen BMP-2 Muteine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit BMPR-IA nicht wesentlich von BMP-2.

Die Bindung von BMP-2 und BMP-2 Muteinen an die BMPR-II Ektodomäne konnte trotz der niedrigen Affinität dieser Wechselwirkung ebenfalls aufgezeichnet werden (Figur 3 B). Eine apparente Dissoziationskonstante K_d von ungefähr 100 nM wurde aus der Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtsbindung abgeleitet, wie in Figur 4 A gezeigt. Die Affinität von BMP-II für die ActR-II Ektodomäne erwies sich als geringfügig höher ($K_d \approx 50 \text{ nM}$). Die apparente K_d für die Bindung von Aktivin an die ActR-II Ektodomäne ist demgegenüber mit 2 - 7 nM angegeben worden (Donaldson et al., 1999). Die Sensogramme, die in Figur 3 B gezeigt sind, zeigen, dass die Muteine

einheitige Unterschiede bezüglich der Gleichgewichtsbindung an den Typ II-Rezeptor BMPR-II aufweisen. Das Mutein A34D band 5-fach schwächer als BMP-2 oder die Muteine D30K und P40A. Die Kinetikkonstanten für die Wechselwirkung zwischen BMP-2 und den Typ II Rezeptoren sind relativ groß ($k_{on} > 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} > 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). Dies verhinderte eine verlässliche Bewertung der k_{on} - oder k_{off} -Werte. Eine spezifische Untergruppe von Muteinen, die Substitutionen an 5 verschiedenen Positionen aufwiesen, zeigte eine Gleichgewichtsbindung (EQ₄₅) an die BMPR-II Ektodomäne, die 3 bis 15-fach niedriger war als die von BMP-2 (Figur 4 D; ausgefüllte Symbole). Diese Abweichungen waren für die BMPR-II Wechselwirkung spezifisch. Die k_{on} Werte dieser Muteine für die BMPR-IA Bindung waren unauffällig.

Beispiel 5: Bindungsdeterminanten und Antagonisten-/Agonistenaktivität von BMP-2 Muteinen

Es wurde beobachtet, dass Muteine mit einer erniedrigten Affinität für BMPR-II sich während des C2C12-Test als kompetitive Inhibitoren von BMP-2 verhalten. Die Determinanten der BMP-2 Muteine für die ActR-II Bindung unterscheiden sich von denen vom BMPR-II (Figur 4 B). Das Mutein H39D zeigte keine Verringerung, und die Muteine A34D sowie L90A eine nur 2-fache Abnahme der ActR-II Affinität. Die Bindungsaaffinität von S88A und L100A war für beide Typ II Rezeptorketten auf ähnliche Weise verändert. Solche differentiellen Wirkungen von Aminosäuresubstitutionen auf die Bindung an verschiedene Rezeptoren erlaubt die Konstruktion selektiver Agonisten, die preferentiell die eine oder andere Rezeptorkette aktivieren.

Im Unterschied zu anderen Rezeptorsystemen wurden im vorliegenden System keine „hot spots“ für die Bindung beobachtet. Es konnte allenfalls eine 5 bis 30-fache Veränderung der Kinetik oder der Gleichgewichtskonstanten in einigen Muteinen beobachtet werden. Es besteht, allerdings die Möglichkeit, dass einige der Hauptdeterminanten in der jetzt vorliegenden Sammlung von BMP-2 Muteinen nicht vertreten sind. Diese möglicherweise fehlenden Determinanten können unter den Resten sein, die nach der Substitution zu Proteinen führten, die nicht exprimiert bzw. gewonnen werden konnten. Beispiele dafür könnten z. B. G27 und W28 sein. Eine andere, eher wahrscheinliche Möglichkeit ist es jedoch, dass Wasserstoffbrücken-

bindungen, die N- oder O-Atome der Hauptpeptidbindungen involvieren, mit den Rezeptoren wechselwirken und damit zur Bindungsaffinität beitragen.

Weiter ist es interessant, dass trotz der kleinen Veränderungen in der Bindungsaffinität die biologische Aktivität einiger der Muteine deutlich erniedrigt war. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Muteine durch eine Aminosäuresubstitution destabilisiert sind und während der 3-tägigen Inkubation im Rahmen des C2C12-Testes teilweise inaktiviert werden. Dies kann jedoch nicht für die antagonistischen Muteine gelten, die im Fall von A34D z. B. eine 100-fach verringerte biologische Aktivität aufweisen. Es ist dagegen eher wahrscheinlich, dass die Diskrepanz in dem Ausmaß der Änderungen bei der physikalischen Rezeptorbindung und der zellulären Aktivität in einigen der Muteine von Aviditätseffekten während der Wechselwirkung der multiplen Bindeepitope von BMP-2 mit multimeren zellulären Rezeptoren in der Membran herrühren.

Beispiel 6: Lokalisierung von Bindungsepitopen

Die Aminosäurepositionen von BMP-2, die die Bindungsaffinität entweder zu BMPR-IA oder BMPR-II Rezeptorketten bestimmen, gehören 2 nicht überlappenden Untergruppen an. Wie in Figur 1 gezeigt ist, verteilen sich diese Determinanten über die gesamte BMP-2 Sequenz. Das raumfüllende Modell (Scheufler et al., 1999) von Figur 5 zeigt jedoch, dass die funktionellen Reste 2 getrennte Epitope auf der Oberfläche des homodimeren BMP-2 Moleküls bilden.

Die Determinanten für die BMPR-IA Wechselwirkung colokalisieren im Wrist-Epitop, dass Reste der Untereinheit 1 (kursive Buchstaben) sowie von Untereinheit 2 (normale Buchstaben) umfasst. Ein Monomer trägt die Reste V26, D30 und W31 aus der langen Schleife bei, die die Faltblätter β -2 und β -3 verbindet, sowie die schwachen Determinanten K101 und Y103, die im Faltblatt β -8 auftreten. Das andere Monomer trägt die Reste I62, L66 und N68 aus der Helix α 3 sowie die Reste F49, P50 und H54 aus der langen Schleife vor Helix α 3 bei. Die Muteine mit Substitutionen in dieser letztgenannten Schleife weisen bemerkenswerterweise verringerte Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten auf. Das mag mit der Beobachtung zusammenhängen, dass

die Reste in dieser Schlaufe die höchsten B-Faktoren von 40 - 90 aufwiesen. Die B-Faktoren sind ein Maß für die Ordnung der Atome im Kristall und für die Genauigkeit, mit der die Atome in dem Proteinmodell definiert sind. Damit sind die B-Faktoren indirekt ein Maß für die Beweglichkeit der Atome in dem Proteinkristall. Eine noch höhere Mobilität dieser Schlaufe in den Muteinen könnte die Wahrscheinlichkeit eines produktiven Zusammentreffens mit BMPR-IA verringern und daher eine Assoziation bremsen. Die schwache Determinante H17 scheint von den anderen funktionellen Wrist-Epitop-Resten getrennt zu sein. Möglicherweise stellen BMP-2 Aminosäurereste, die bis jetzt nicht analysiert sind und zwischen H17 und H54 liegen, weitere Kontaktstellen für BMPR-IA dar.

Das Knuckle-Epitop von BMP-2, das in die Bindung von BMPR-II involviert ist, setzt sich aus den Resten nur einer Untereinheit zusammen. Die Reste A34 und H39 treten im Faltblatt β 3 bzw. β 4 auf, während S88 und L90 in β 7 und L100 in β 8 vorkommen. Der Rest E109, von dem nach Substitution durch Arginin festgestellt wurde, dass er ein Mutein mit höherer Affinität für BMPR-II ergab, kann ein weiterer Kontaktrest sein. Das Knuckle-Epitop scheint kleiner als das Wrist-Epitop zu sein, da viele Reste an der Grenze zum Knuckle-Epitop verändert werden konnten, ohne eine nachweisbare Wirkung auf die Rezeptorbindung über die biologische Aktivität zu haben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Knuckle-Epitop weitere funktionelle Reste umfasst.

Das homodimere BMP-2 Protein hat eine 2-fache Symmetriearchse, die in Figur 5 in der Papierebene liegt und von oben nach unten verläuft. Auf der Rückseite des Proteins gibt es daher ein zweites Paar von Wrist- und Knuckle-Epitopen.

Beispiel 7: Kombination von Aminosäuresubstitutionen in BMP-2 Doppelmutanten

Die gleichzeitige Substitution von 2 an der niederaffinen Bindung an BMPR-II beteiligten Aminosäuren verstärkt die Auswirkungen auf die biologische Aktivität beträchtlich. Wie aus der nachfolgenden Tabelle III ersehen werden kann, war die inhibitorische Aktivität von doppelt substituierten Muteinen beträchtlich erhöht. Erstaunlicherweise zeigte dabei das Kombinationsprotein A34D/D53A, bei dem also sowohl eine Aminosäure aus dem Wrist-Epitop als auch eine Aminosäure aus dem Knuckle-Epitop ersetzt worden sind,

bei 20 nM BMP-2 die höchste antagonistische Aktivität aller untersuchten Muteine. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, daß die D53A Substitution (Wrist-Epitop) im einfach substituierten Mutein eine Zunahme der BMPR-IA Affinität (und auch der biologischen Aktivität) bewirkt, die für die biologische Aktivität erforderliche Wechselwirkung mit dem BMPR-II jedoch gleichzeitig durch A34D effizient geschwächt ist.

Insgesamt zeigt sich jedoch, daß die Kombination von zwei Mutationen im Bereich der für die niederaffine Bindung verantwortlichen Aminosäuren eine beträchtliche antagonistische Wirkung zur Folge hat.

Beispiel 8:**Biologische Aktivität der BMP-2 Heterodimere: ALP-Assay in C2C12-Zellen**

Das Heterodimer BMP-2/B2m- induzierte eine ALP-Aktivität in Serum-ausgehungerten C2C12-Zellen mit einem ED₅₀-Wert von 11 +/- 1 nM in einer Dosis-abhängigen Weise, die den ED₅₀-Werten des Homodimers B2m-/B2m-(ED₅₀: 16 +/- 1 nM) bzw. des Homodimers BMP-2/BMP-2 (ED₅₀: 19 +/- 2 nM), wie in Figur 7 A dargestellt, ähnelt. Die ähnliche biologische Aktivität dieser 3 Homo- bzw. Heterodimere ist in Übereinstimmung mit den Biosensor-basierten Bindungsstudien, die ähnliche Affinitäten dieser Proteine für die BRIA bzw. BRII-Ektodomänen gezeigt haben.

Ferner wurde die Aktivität der Heterodimer BMP-2- Varianten B2el-/B2m- und B2ell-/B2m- mit der Aktivität der entsprechenden Homodimere (B2m-/B2m-, B2el-/B2el-, B2ell-/B2ell-) und mit der von BMP-2/BMP-2 verglichen. Das Homodimer B2el-/B2el- zeigte keine signifikante biologische Aktivität, sogar bei Konzentrationen von bis zu 250 nM (Figur 7 B). Das Heterodimer B2el-/B2m- zeigte eine verringerte biologische Aktivität, gemessen durch die Bestimmung der ALP-Aktivität, die etwa 25 % der Aktivität des Heterodimers BMP-2/B2m- bei einer Konzentration von 250 nM (Figur 7 B) entsprach. Aus der Rechts-Verschiebung der Dosis-Antwortkurve des Heterodimers B2el-/B2m- kann ein ED₅₀-Wert abgeschätzt werden, der etwa 10 mal niedriger ist als jener des Homodimers B2m-/B2m-.

Das Homodimer B2ell-/B2ell-, das in beiden „knuckle“-Epitopen defizient ist, wies keine signifikante ALP-Aktivität auf (Figur 7 B). Überraschenderweise war das Heterodimer B2ell-/B2m- nicht in der Lage, eine ALP-Aktivität in C2C12-Zellen zu induzieren (Figur 7 B), obwohl dieses Heterodimer ein Epitop für die BRII- und 2 Epitope für die BRI-Bindung aufweist. Keine signifikante Aktivität wurde für das Heterodimer B2ell-/B2m- beobachtet. Da die Standardabweichung 5 willkürliche ALP-Einheiten beträgt (Figur 7 C), ist die Aktivität des Heterodimers B2ell-/B2m- weniger als 0,2 % der Aktivität des Heterodimers BMP-2/B2m-, welches eine maximale Antwort von 2400 Einheiten (Figur 7 C) hervorrief.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die beobachteten Effekte von Heterodimeren BMP-2 Muteinen auf die Signal-Kaskade, die zur ALP-Aktivität führt, belegen, dass 2 funktionelle „wrist“-Epitope zur vollständigen Aktivierung dieses Signalweges erforderlich sind, während 2 „knuckle“-Epitope zur Aktivierung des Liganden-gebundenen dimeren BRI erforderlich sind. Aus diesen Daten zusammen mit den durch Biosensor-Analyse erhaltenen Ergebnissen ist es offensichtlich, dass BMP-2 Proteine mit nur einem intakten „knuckle“-Epitop (d. h. Typ II-Rezeptor-Epitop) nicht-funktionell bezüglich der Induktion der ALP-Aktivität sind, während BMP-2 Muteine mit nur einem intakten „wrist“-Epitop eine Restaktivität von ungefähr 25 % beibehalten.

Beispiel 9: Antagonistische Aktivität des Heterodimers B2ell-/B2m-

Das Heterodimer B2ell-/B2m- weist die Eigenschaft eines hochaffinen vollständigen Antagonisten auf. Die in Figur 8 dargestellte Dosis-abhängige Inhibition des Heterodimers B2ell-/B2m- zeigt eine halb-maximale Inhibition bei 20 nM bei Vorhandensein von 10 nM BMP-2/B2m-. Größere Mengen sind erforderlich bei Vorhandensein von 20 nM BMP-2/B2m-. Ähnliche Dosis-Inhibitionskurven wurden mit dem Homodimer B2m-/B2m- und BMP-2 erhalten. Der IC₅₀-Wert ist lediglich doppelt so hoch wie der ED₅₀-Wert des agonistischen BMP-2 Proteins. Die Inhibition ist annähernd vollständig bei einer Konzentration von 250 nM Heterodimer B2ell-/B2m-. Die Verwendung dieses Testsystems zeigt klar, dass die Verringerung der ALP-Aktivität nicht auf die falsch gefaltete BMP-Proteinstruktur zurückzuführen ist, sondern vielmehr bestimmte Veränderungen innerhalb definierter Rezeptor-Bindungsepitope

widerspiegelt. Am wahrscheinlichsten ist hierbei, dass die antagonistische Eigenschaft des Heterodimers auf seine hochaffine Bindung an BRIA in C2C12-Zellen zurückgeht, und dadurch die Signaltransduktion des Wildtyp-Proteins BMP-2/B2m-blockiert.

Tabelle III

Erhöhte Effekte bei den kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} für die Assoziation und Dissoziation des Komplexes mit der BMPR-IA Ektodomäne; Gleichgewichtsbindung bei 45 nM Konzentrationen, EQ₄₅, an die BMPR-II und ActR-II Ektodomänen. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Gegenwart von 250 nM Mutein, ALP(250), wurde in Abwesenheit und Gegenwart von 10 nM oder 20 nM BMP-2 bestimmt.

Mutein	Epitop	BMPR-IA		BMPR-II	ActR-II		ALP(250)		
		k_{on}	k_{off}	EQ ₄₅			-	+10 nM BMP-2	+20 nM BMP-2
				(var)/(wt)					(% BMP-2)
BMP-2		1,0	1,0	0,99	1,0		100	320	220
H39D	2	1,1	0,79	0,24	0,79		18	100	82
S88A	2	1,1	0,78	0,29	0,32		2,4	65	71
L100A	2	1,2	0,81	0,22	0,34		2,0	32	18
H39D/S88A	2/2	1,2	0,88	0,09	0,35		<0,5	34	50
H39D/L100A	2/2	1,1	0,90	0,02	0,33		0,6	2,6	4,2
D30A	1	3,0	0,97	1,0	1,0		62	330	220
A34D	2	0,56	0,56	0,06	0,38		<0,5	<0,5	2,9
D53A	1	1,1	1,2	0,99	1,2		130		
D30A/A34D	1/2	1,9	0,85	0,02	0,31		<0,5	2,2	7,4
A34D/D53A	2/1	1,1	1,5	<0,02	0,31		<0,5	<0,5	0,7

Zitierte Literatur

Astrom et al. (1999), Mamm. Genome 10, S. 299 - 302

Blau et al. (1983), Cell 32, S. 1170 - 1180

Celeste et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87, S. 9843-9847

DeSantis & Jones (1999) Curr Opin Biotechnol. 10, S. 324-330

Donaldson et al. (1999), Endocrinology 140, S. 1760 - 1766

Kirsch et al. (2000) (a) FEBS Lett 468, S.215-219

Kirsch et al. (2000) (b) EMBO J. 19, 3314 - 3324

Kirsch et al. M. (2000) (c) Nature Struct Biol. 7, 492 - 496

Madisen et al. (1998) DNA 7 , S. 1-8

Massague et al. (1998), Ann. Rev. Biochem. 67, S. 753 - 791

Matzuk & Bradley (1992), Biochem. Biophys. Acta 1130, S. 105 - 108

Rosenzweig et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7632 - 7636

Ruppert et al. (1996), Eur. J. Biochem. 237, S. 295 - 302

Scheufler et al. (1999) J Mol Biol 287, S. 103-115

Shen et al. (19996), Eur. J. Biochem. 240, S. 252 - 261

ten Dijke et al. (1993), Oncogene 8, S. 2879 - 2887

Wang et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, S. 1657 - 1662

Wozney et al. (1998) Science 242, S.1528-1534

Wuytens et al.(1999) J Biol Chem 274, S. 9821-9827.

Patentansprüche

1. Mutein einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β , wobei das Mutein nach Bildung eines Homodimers antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweist und wobei das Mutein an einer oder mehreren Position(en) verändert ist, die im unveränderten Protein an einer niederaffinen Bindung an seinen Rezeptor beteiligt ist/sind.
2. Mutein nach Anspruch 1, wobei das Mutein durch Deletion und/oder Substitution und/oder Insertion und/oder Modifikation einer oder mehrerer Aminosäuren verändert ist.
3. Mutein nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Mutein von einer Kette eines BMP-2-ähnlichen Proteines abgeleitet ist und im Mutein eine oder mehrere Position(en) aus dem „Knuckle“-Epitop verändert ist/sind.
4. Mutein nach Anspruch 3, wobei das BMP-2-ähnliche Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6 und GDF-7 umfaßt.
5. Mutein nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Aminosäure(n), ausgewählt aus der Gruppe der Aminosäuren, die die oberflächenexponierten Bereiche aus den β -Faltblattstrukturen β 3, β 4, β 7, β 8 und/oder β 9 bilden, deletiert und/oder substituiert und/oder modifiziert ist/sind und/oder daß mindestens einer der genannten oberflächenexponierten Bereiche durch Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren verändert ist.
6. Mutein nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der die β -Faltblätter β 3 und β 4 verbindenden Aminosäuren deletiert und/oder substituiert und/oder modifiziert ist und/oder daß in den die β -Faltblätter β 3 und β 4 verbindenden Aminosäurebereich ein oder mehrere Aminosäuren insertiert sind.

7. Mutein nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der folgenden Aminosäuren deletiert, substituiert und/oder modifiziert ist, wobei sich die Positionsangaben auf BMP-2 beziehen:

V33 A34 P35 P36 G37 Y38 H39 F41 Y42 T82 E83 L84 S85 A86 I87 S88 L90
K97 V98 V99 L100 V107 E109 und G110.

8. Mutein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 50 % Identität mit einer Kette eines BMP-2-ähnlichen Wachstumsfaktors aus der TGF- β -Superfamilie hat und antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweist.

9. Mutein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das Mutein von einem Protein der TGF- β -/Aktivin-Familie abgeleitet ist und im Mutein eine oder mehrere Position(en) aus dem „Wrist“-Epitop verändert ist/sind.

10. Mutein nach Anspruch 9, wobei das Protein der TGF- β -/Aktivin-Familie aus der Gruppe ausgewählt ist, die TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Aktivine, Inhibine, BMP-11 und GDF-8 umfaßt.

11. Mutein nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe der Aminosäuren, die die oberflächenexponierten Bereiche aus der Helix vor der Faltblattstruktur β 1, der Faltblattstruktur β 1, der langen Schleife zwischen den Faltblattstrukturen β 2 und β 3, der Schlaufe vor der Helix α 3, der Helix α 3 sowie der Faltblattstruktur β 8 bilden, deletiert und/oder substituiert und/oder modifiziert ist/sind und/oder daß mindestens einer der genannten oberflächenexponierten Bereiche durch Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren verändert ist.

12. Mutein nach mindestens einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der folgenden Aminosäuren deletiert, substituiert und/oder modifiziert ist, wobei sich die Positionsangaben auf BMP-2 beziehen:

K5, S13, V26, G27, W28, N29, D30, W31, P48, F49, P50, A52, D53, H54, N59, I62, V63, L66, N68, S69, V70, K101 und Y103.

13. Mutein nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 50 % Identität mit einer Kette eines TGF- β -/Aktivin-ähnlichen Wachstumsfaktors aus der TGF- β -Superfamilie hat und antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweist.
14. Mutein nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem zielspezifischen Molekül kovalent verbunden ist.
15. Mutein nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das zielspezifische Molekül mit dem Mutein ein Fusionsprotein bildet.
16. Derivat eines Proteins aus der TGF- β -Superfamilie, umfassend ein Mutein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 und eine weitere Kette eines Proteins aus der Gruppe der TGF- β -Superfamilie oder ein weiteres Mutein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15.
17. Derivat nach Anspruch 16, umfassend ein Homodimer aus Muteinen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15.
18. Derivat nach Anspruch 16, umfassend ein Heterodimer aus Muteinen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein Mutein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 und/oder ein Derivat gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 und/oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.
20. Verwendung eines Muteins nach einem der Ansprüche 1 bis 15 und/oder eines Derivates nach einem der Ansprüche 16 bis 18 zum Herstellen einer Zusammensetzung zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen, die

durch ein Protein aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β vermittelt werden.

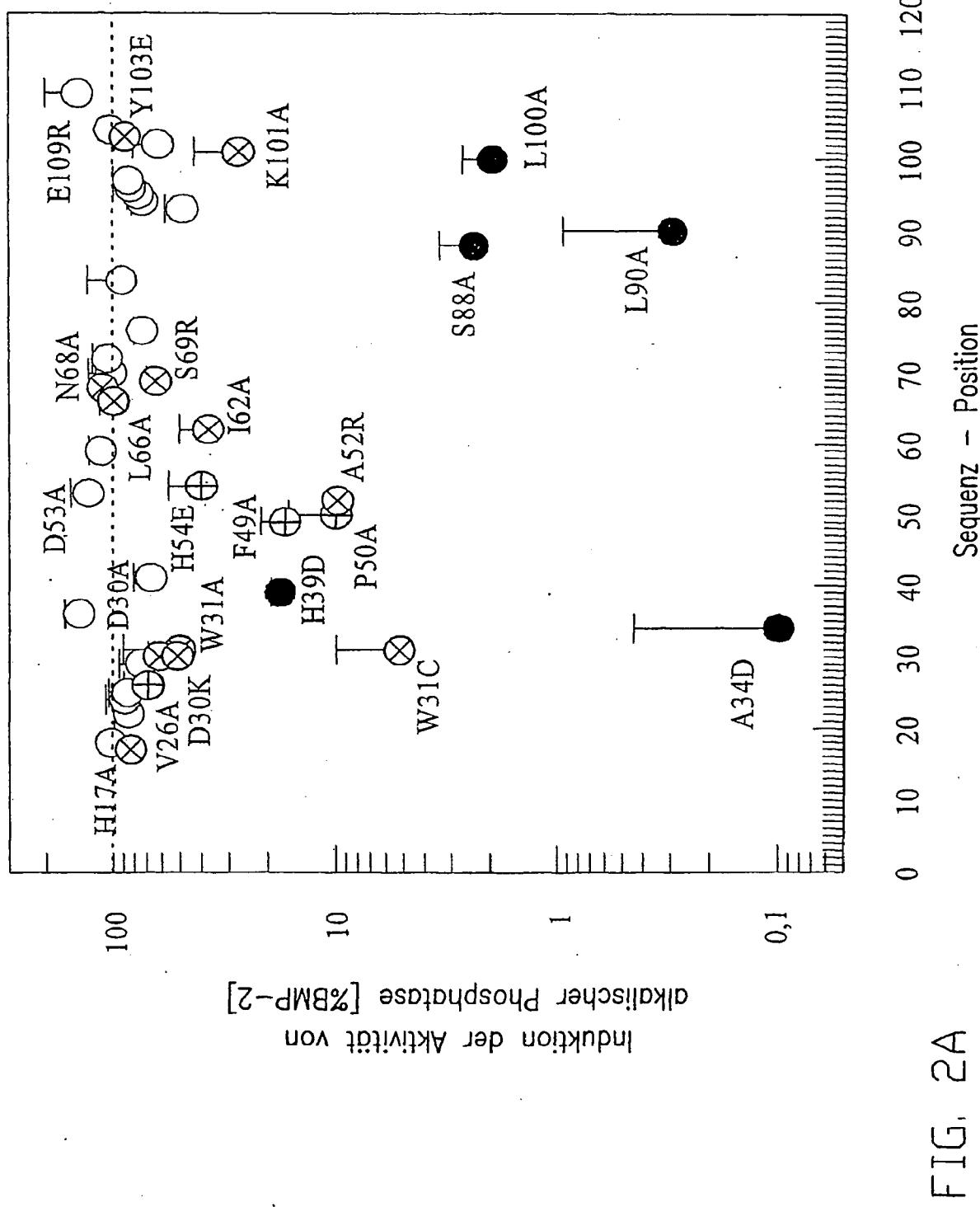
21. Antikörper gegen ein Mutein nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder ein Derivat gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18.
22. Nukleinsäure, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus:
 - (i) einer für ein Mutein nach einem der Ansprüche 1 - 15 kodierenden Nukleinsäuresequenz;
 - (ii) einer zu der Nukleinsäuresequenz nach (i) komplementären Nukleinsäuresequenz und
 - (iii) einer Nukleinsäuresequenz, die mit einer Nukleinsäuresequenz nach (ii) hybridisiert und für ein Mutein kodiert, das nach Bildung eines Homodimers antagonistische oder partiell agonistische Aktivität aufweist.
23. Nukleinsäure nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierung nach (iii) unter stringenten Bedingungen durchgeführt wird.
24. Nukleinsäure nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure genomische DNA, cDNA, synthetische DNA oder RNA ist.
25. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, weiterhin umfassend einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für ein Mutein kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht.
26. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 22 bis 28.
27. Wirtsorganismus, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 22 bis 25 oder ein Vektor nach Anspruch 26.

28. Verfahren zum Herstellen eines Muteines gemäß einem der Ansprüche 1 - 15, umfassend das Kultivieren eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 27 unter zur Expression geeigneten Bedingungen und ggf. das Aufreinigen des exprimierten Muteins.

1 / 17

FIG. 1

2/17



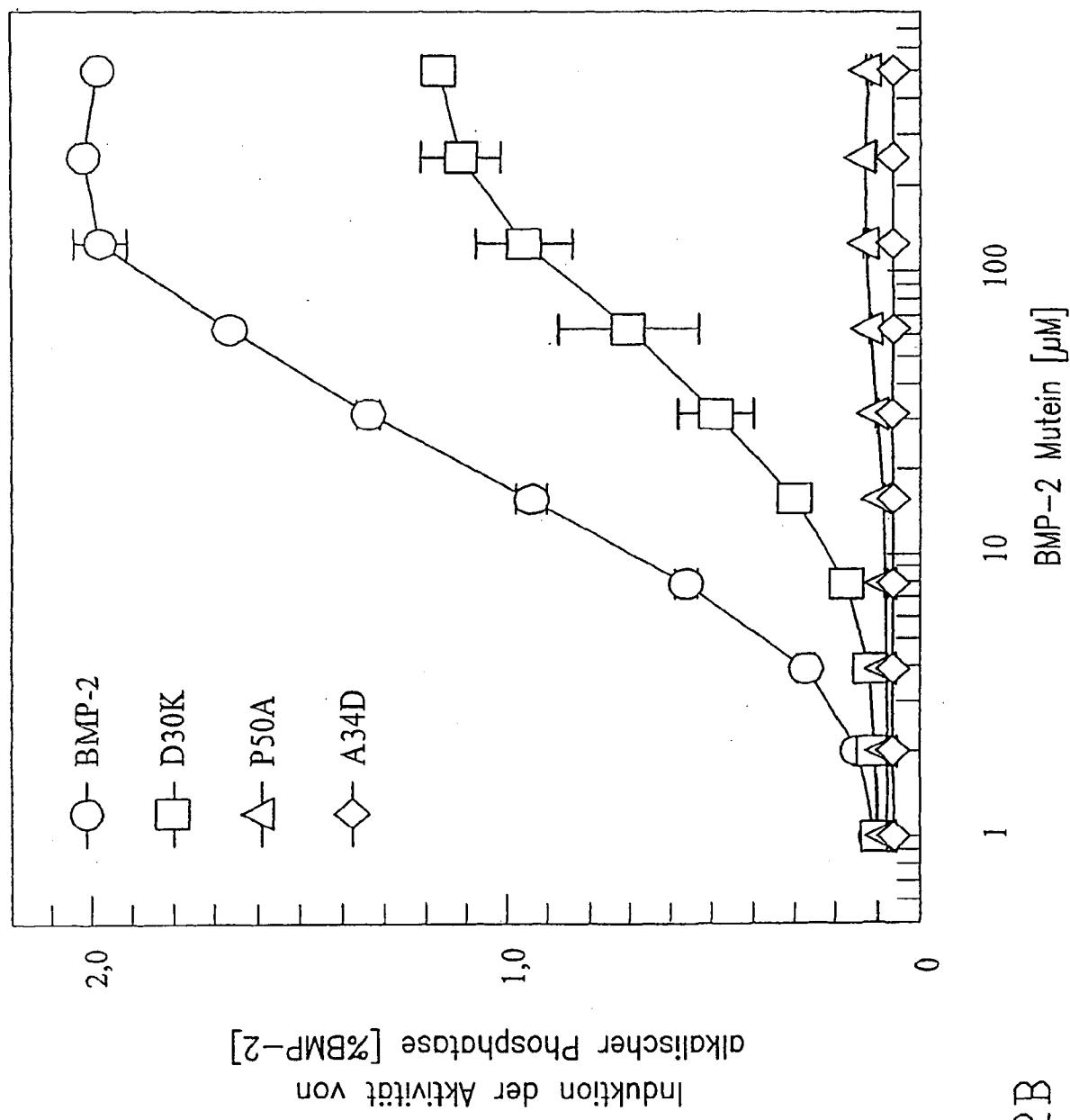
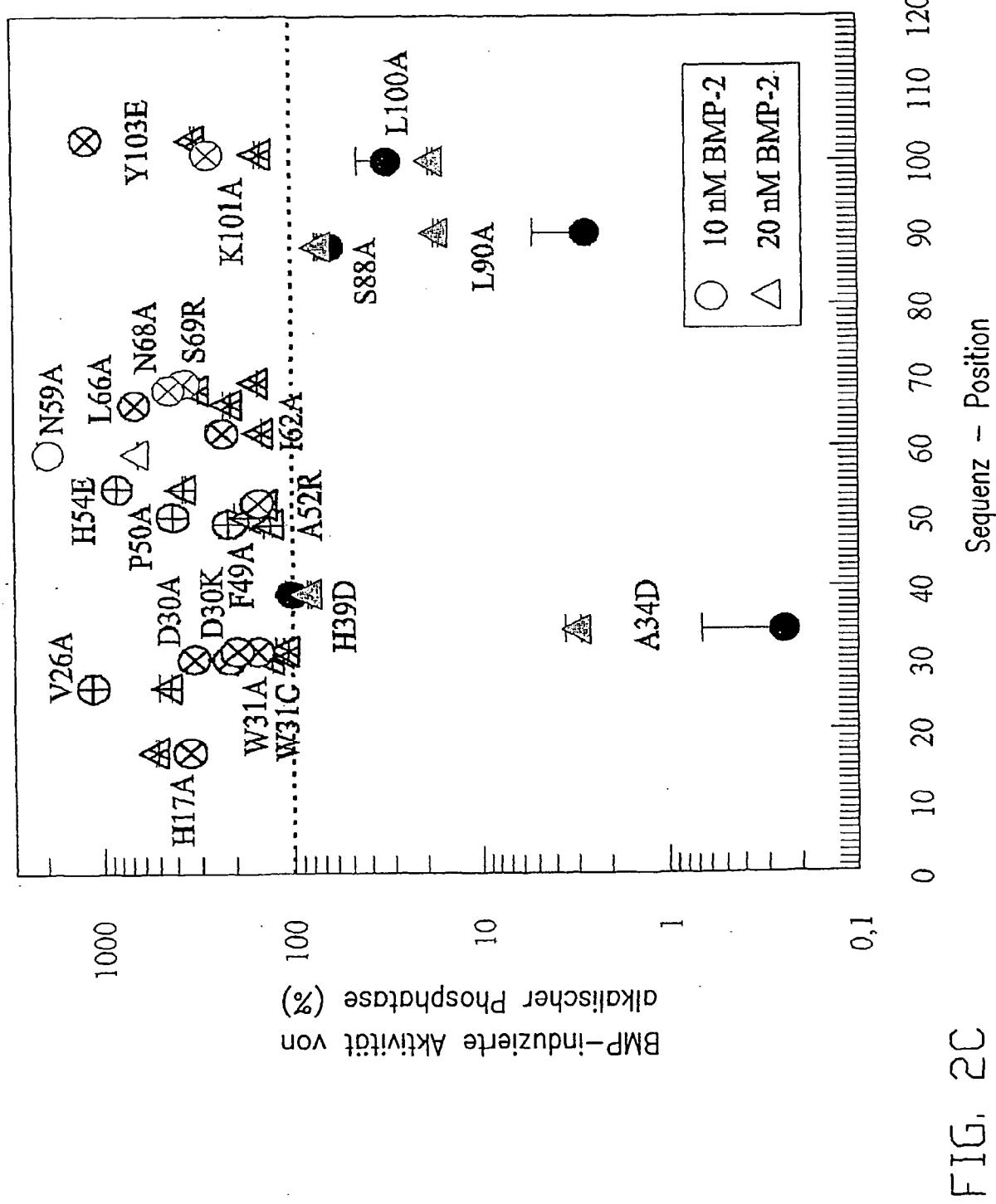
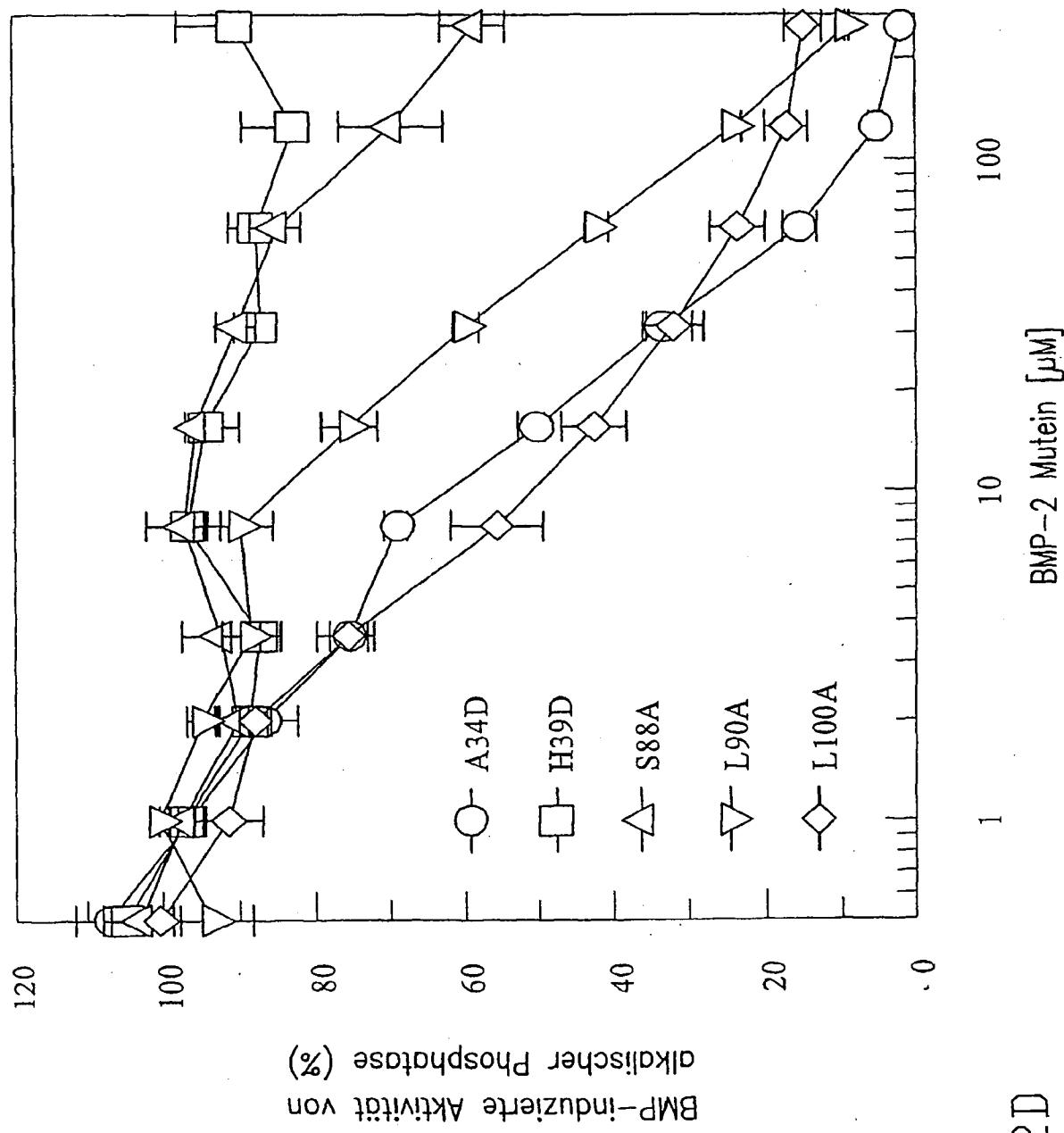


FIG. 2B

4/17





6/17

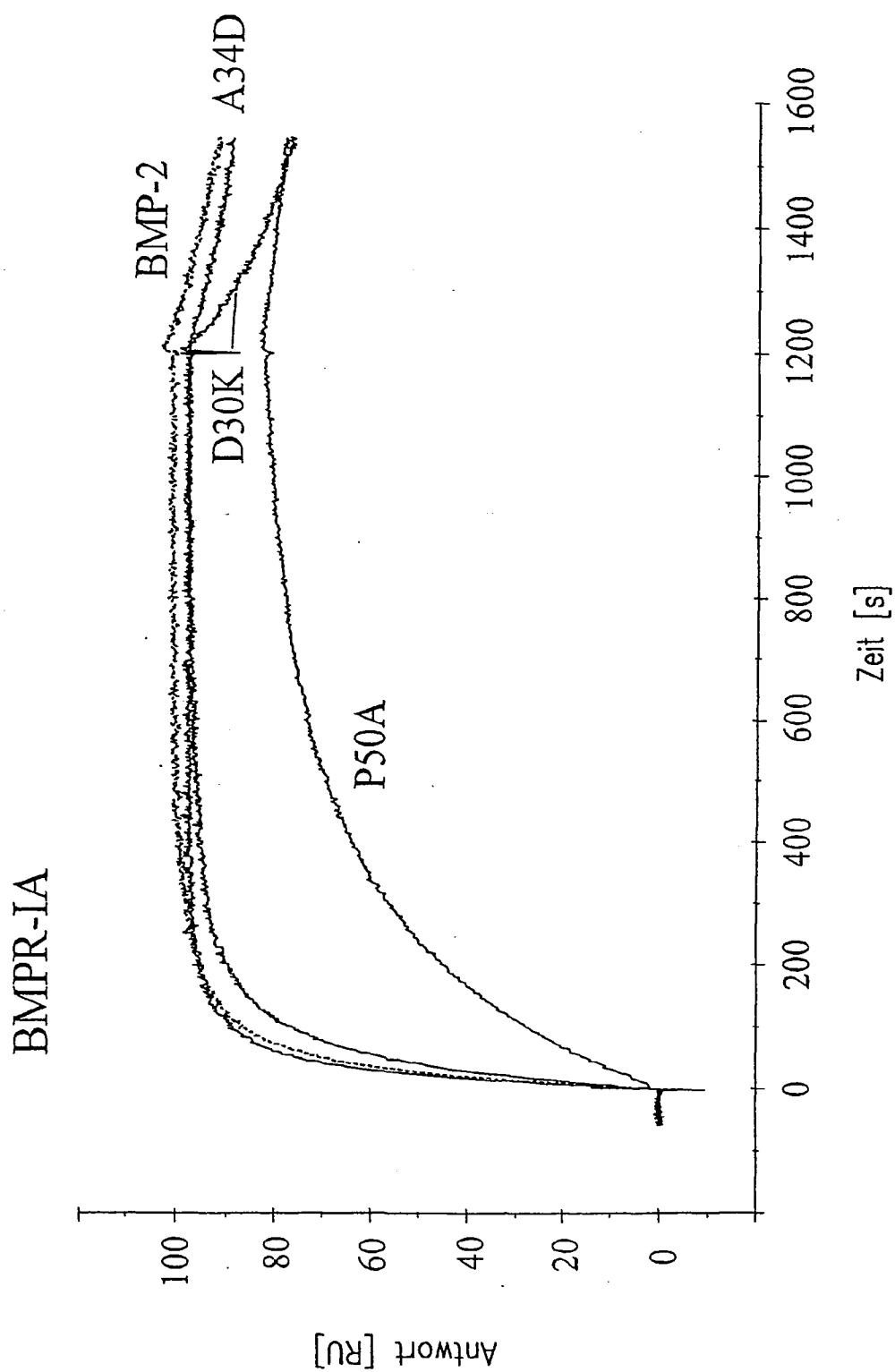


FIG. 3A

7/17

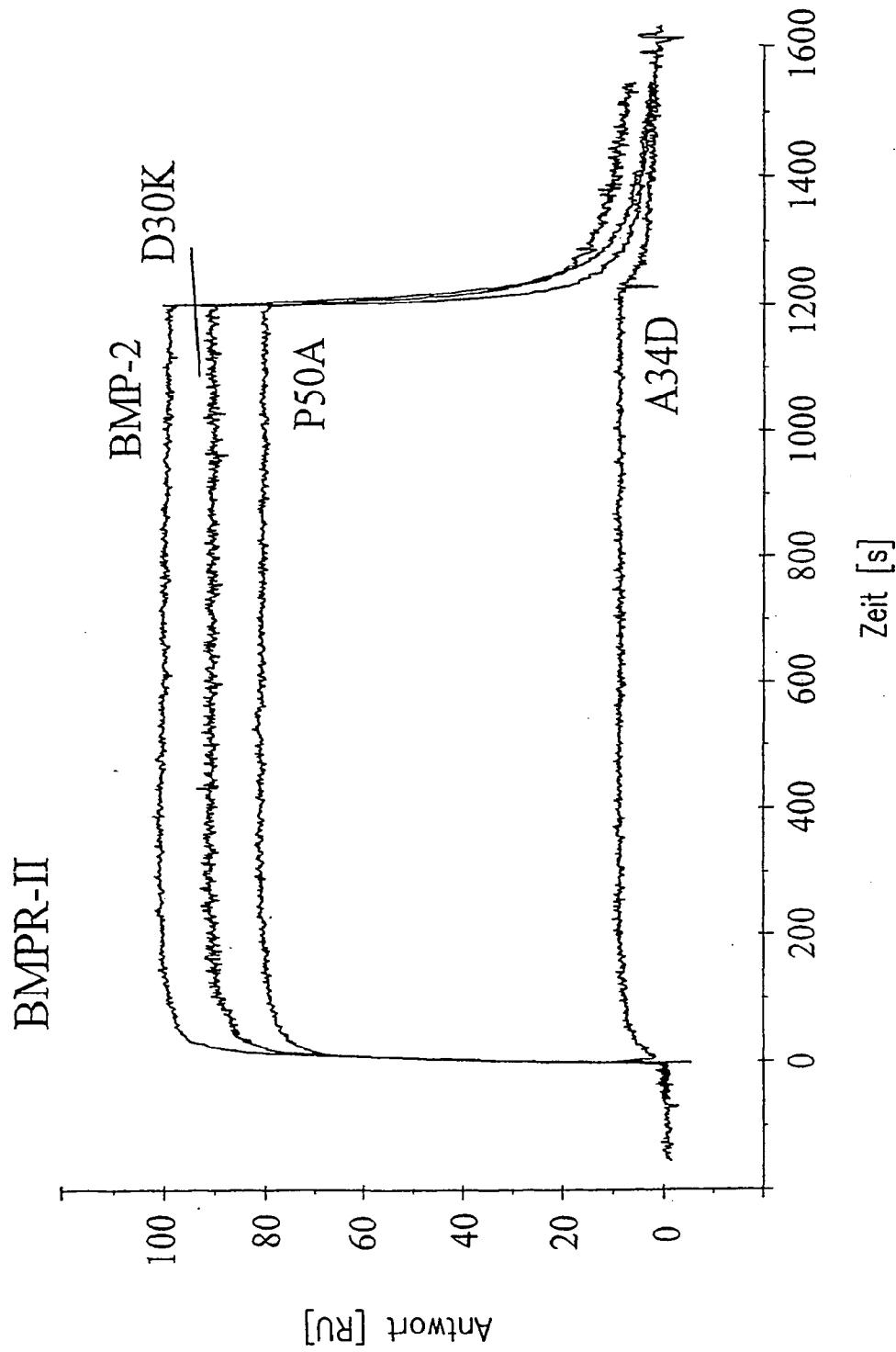


FIG. 3B

8/17

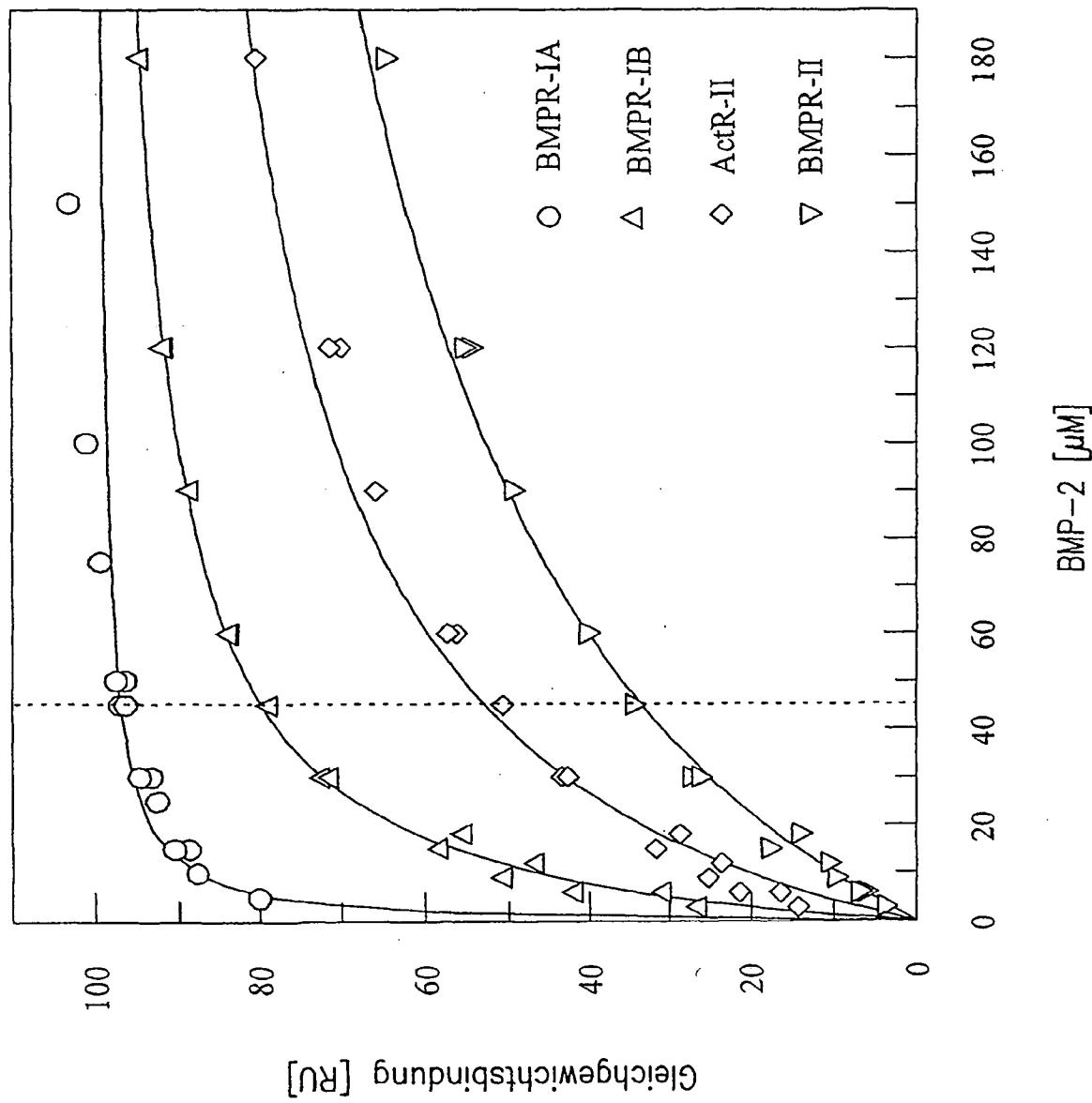


FIG. 4A

9/17

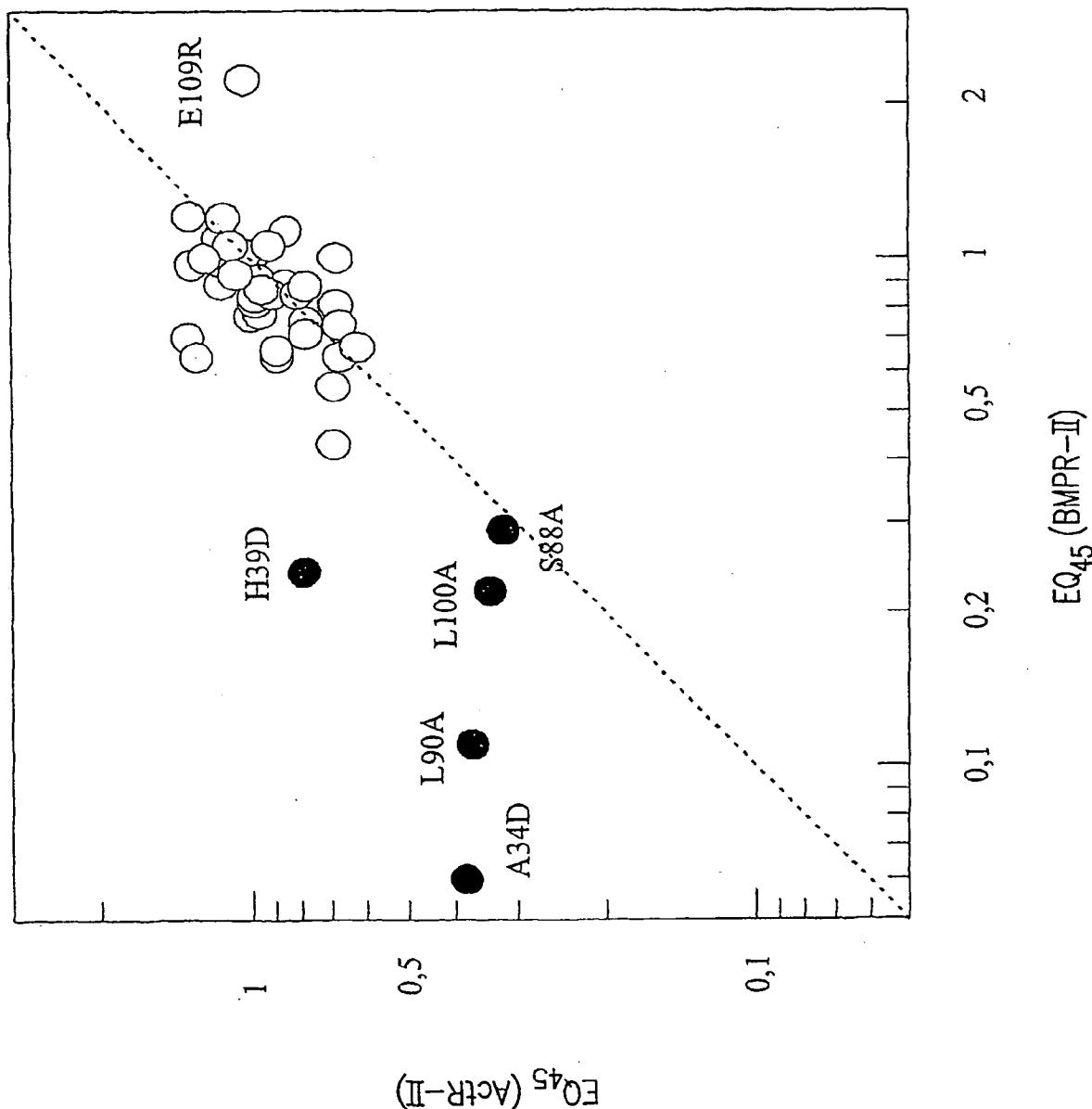


FIG. 4B

10/17

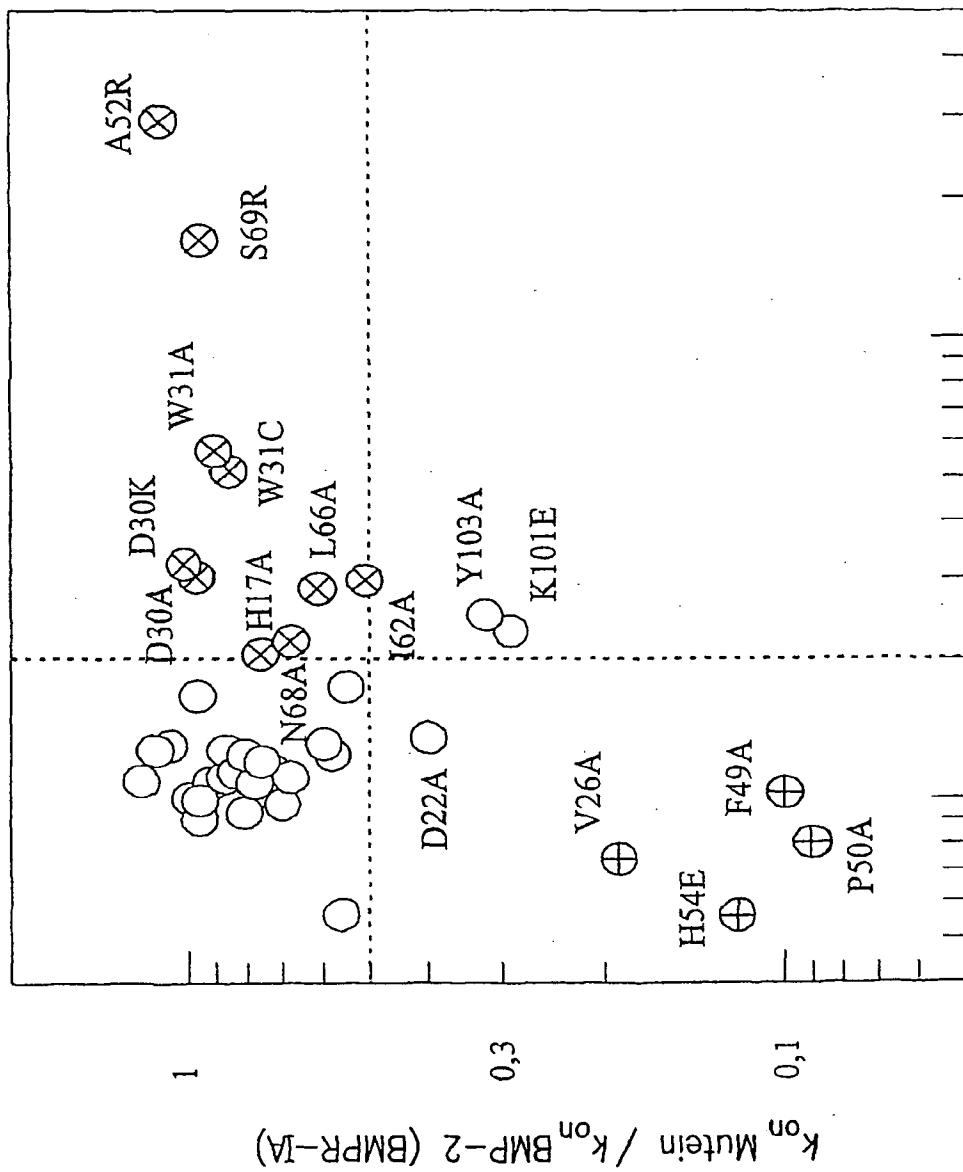


FIG. 4C

 $k_{\text{off}}^{\text{Mutant}} / k_{\text{off}}^{\text{BMP-2}} (\text{BMPPR-IA})$

11/17

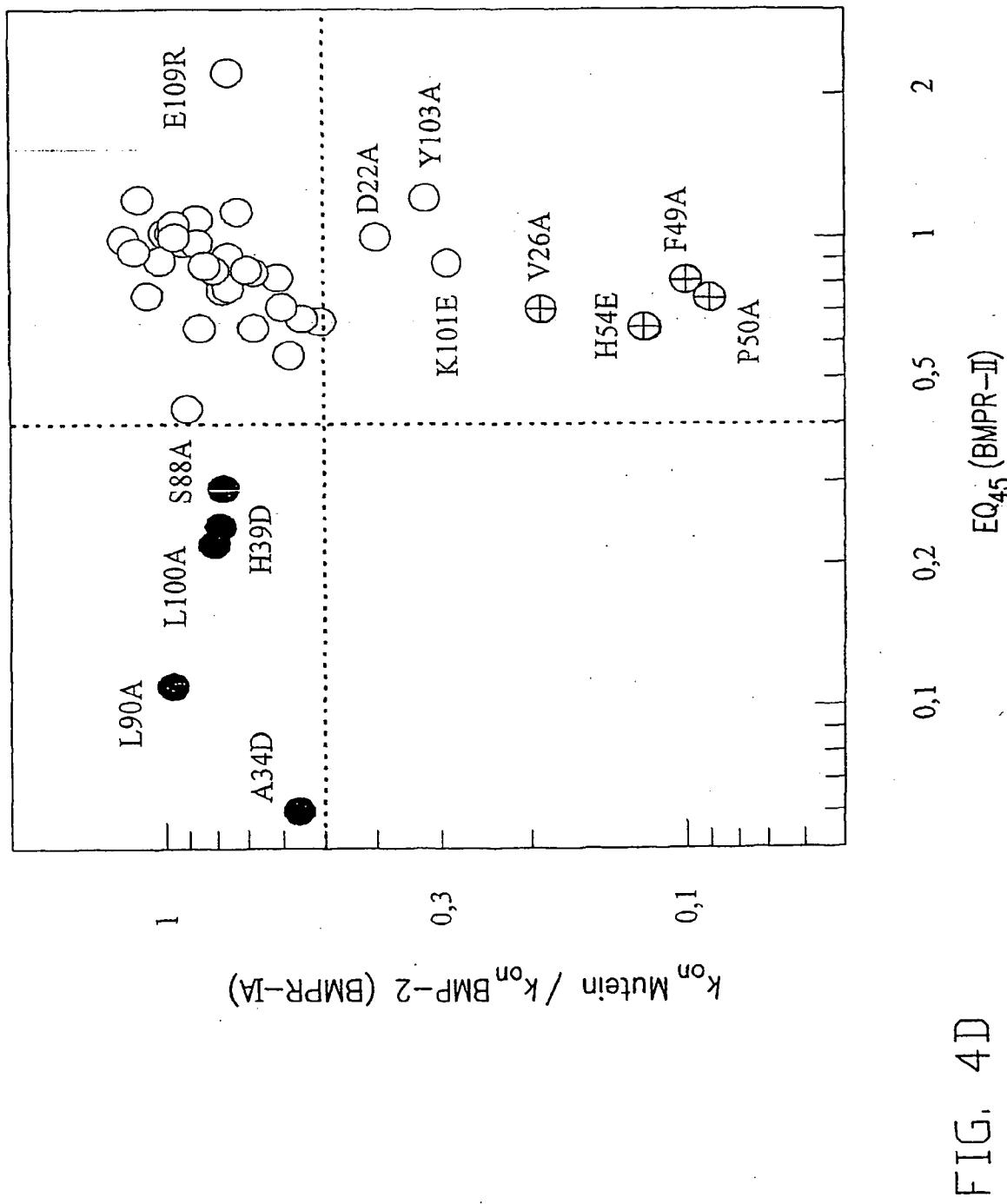
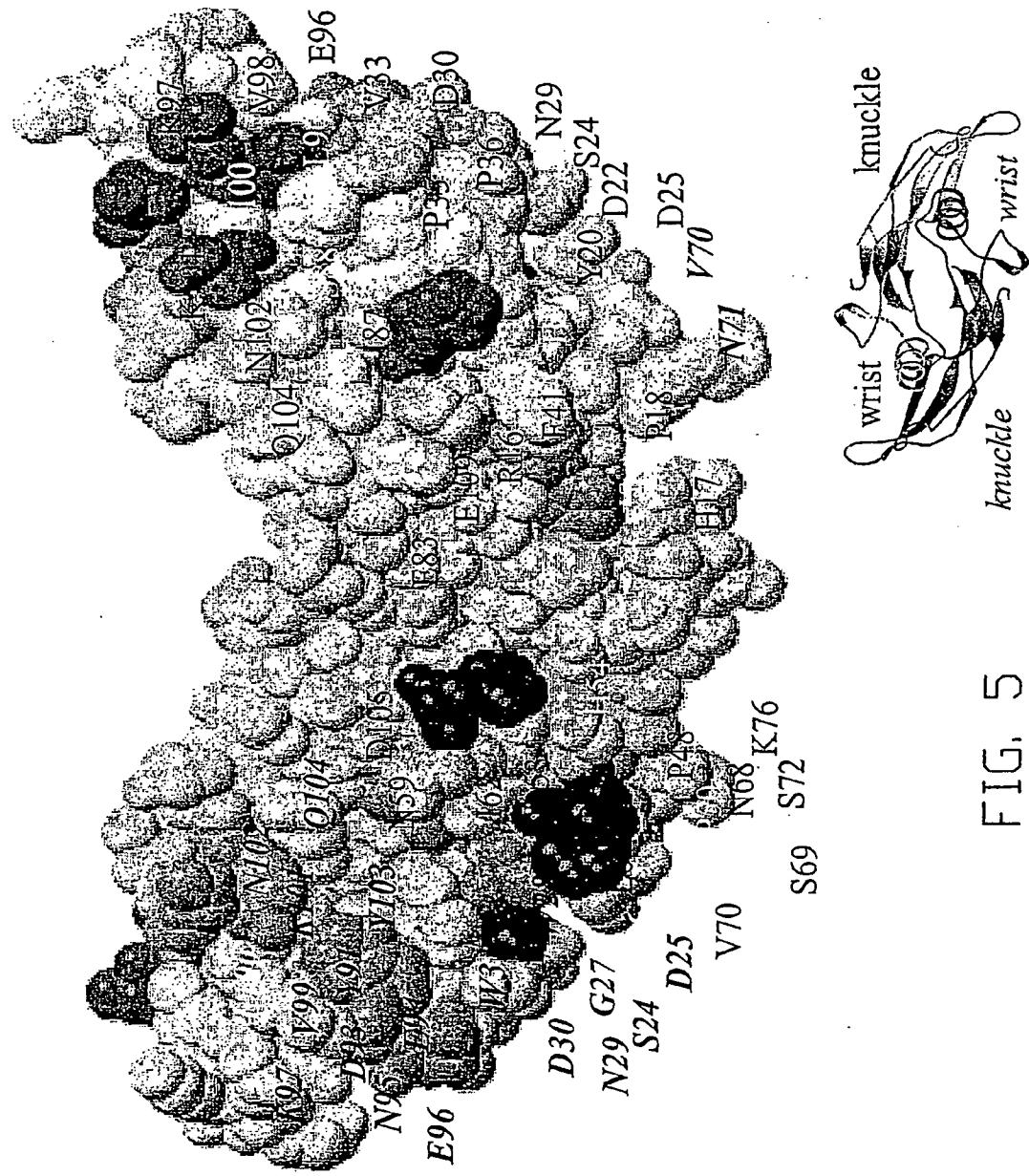


FIG. 4D

12/17



5
FIG.

13/17

20

10

-10

-20

-30

hBMP-2

hBMP-4

hBMP-5

hBMP-6

hBMP-7

hBMP-8

hGDF-5

ngDE-6

ngDE-7

ngDE-3

hGDF-1

hBMP-10

hGDF-2

hBMP-15

hGDF-9B

hGDF-9

hBMP-3

hGDF-10

hAct-A

hAct-B

hAct-C

hBMP-11

hGDF-8

TGF-b1

hTGF-b2

hTGF-b3

hInh-a

hMIS

hGDNF

Consensus

QAKHHQQRKRIKS.SCKRHPFLYV

SPKHHSSQRARKNNKNCRHSSLYV

NQNRNKSSSHQDSSRMSSVGDYNTSEQKQACKKHELYV

QQSRNRSSTQSQDVARYSSASDYNSSSELKTACRKHELYV

STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSSDQRQACKKHELYV

AVRPLRQQPKKSNELPQANRLPGIFDDVHGSHGRQVCRRELYV

APSATRQGKRPSSKNLKARCSRKALHV

TAFASRHGKRRHGKKSRSRCSRKSLHV

AAISVPKGFCRNFCHRHQQLFL

DAEPVVLGGPGGACRARRLYV

NAKGNYCKRTPLYI

SAGAGSHCQKTSLRV

QACSIEDASCPSSQEHDGSVNNQCSLHPYKV

QADGISAETASSSKHSGPENNQCSLHPFQI

GQETVSSSELKKPLGPASEFNLSSEYFRQELLPQNECELHDFRL

QWIEPRNCARRYLKV

QWDEPRVCSRRYLKV

GLECD-GKVNIICCKQFFFV

GLECD-GRTNLICCRQQFFI

GIDCQ-GGSRMCCRQFFFV

NLGLIDCDEHSSSERCCRYPLTV

DFGILDCCDEHSTESRCCRYPLTV

ALDNTYCF-SSTEKNCCVRLQLYI

ALDAAYCF-RNVQDNNCCCLRPLYI

ALDNTYCF-RNLEENCCVRLQPEEPAAHANCHRVVALNI

STPLMSWPWSPPSALRLLQRPPEPAAHANCHRVVALNI

SAGATAADGPCALRELSV

SPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENSRGKGRRL. G2RGKNRGCVLTAIHL

FIG. 6A

14/17

60

50

40

30

hBMP-2	DFS - DVGWNNDWIVAPPGYHAFYCHGECPFPPLADHLN	STNHAI VQTLVN
hBMP-4	DFS - DVGWNNDWIVAPPGYQAFYCHGDCPFPPLADHLN	STNHAI VQTLVN
hBMP-5	SFR - DLGWNQDWIIAPEGYAAFYCDGECSECPFPPLNAHMN	ATNHAI VQTLVH
hBMP-6	SFQ - DLGWNQDWIIAPKGYAANYCDGECSECPFPPLNAHMN	ATNHAI VQTLVH
hBMP-7	SFR - DLGWNQDWIIAPEGYAAFYCEGECAFPLNSYMN	ATNHAI VQTLVH
hBMP-8	SFQ - DLGWNLDWWVIAPQGYSAYYCEGECSECPFPPLDSCMN	ATNHAI LQSLVH
hGDF-5	NFK - DMGWNDDWIIAPLEYEAFHCEGLCEFPPLRSHLE	PTNHAVIQTLMN
mGDF-6	NFK - ELGWNDDWIIAPLEYEAYHCEGVCDFPPLRSHLE	PTNHAVIQTLMN
mGDF-7	DFK - ELGWNDDWIIAPLDYEAYHCEGVCDFPPLRSHLE	PTNHAI IQTLLN
mGDF-3	NFQ - DLGWNHKWWVIAPKGFMANYCHGECPFSMTTYLN	SSNYAFMQALMH
hGDF-1	SFR - EVGWHHRWWVIAPRGFLANYCQGQCALPVALSGSGPPALNHA	AVLRALMH
hBMP-10	DFK - EIGWDSWIIAAPPGYEAYECRGVCNYPLAEHLT	PTKHAI IQALVH
hGDF-2	NFE - DIGWDSWIIAAPPKEYEAYECKGGCFFPLADDVT	PTKHAI VQTLVH
hBMP-15	SFH - QLGWDHWWIIAAPPKEYEAYECKGGCFFPLADDVT	SPNHAI QSLVNN
hGDF-9B	SFR - QLGWDNWIVAPHRYNPRYKGDCTRVLPYGLN	SPNHAI IQNLIN
hGDF-9	SFS - QLKWDNWIVAPHRYNPRYKGDCTRVLPYGLN	SPVHTMVQNIY
hBMP-3	DFA - DIGWSEWIISPKSFDAYYCSCGACQFPMPKSLK	PSNHATIQSIVR
hGDF-10	DFA - DIGWNNEWIISPKSFDAYYCAGACEFPMPKIVR	PSNHATIQSIVR
hAct-A	SFK - DIGWNNDWIIAAPSGYHANYCEGECPSHIAGTSGSSSL	SFHSTVINHYRM
hAct-B	DFR - LIGWNNDWIIAAPTGYGNYCEGSCPAYLAGVPGSASS	SFHSTAVVNQYRM
hAct-C	DFR - EIGWHHDWIIQPEGYAMNFICIGQCPHIAGMPGIAA	SFHSTAVLNLLKA
hBMP-11	DFE - AFGW - DWIIAPKRYKANYCQCEYMFMM - - Q	KYPHTH
hGDF-8	DFE - AFGW - DWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFL - - Q	KYPHTH
TGF-b1	DFRKDLGWK - WIHEPKGYHANFCLGPCPYIWS - - L	DYQYSKVLALYN
hTGF-b2	DFKRDLGWK - WIHEPKGYNANFCAGACCPYIWS - - S	DYQHSRVLSLYNN
hTGF-b3	DFRQDLGWK - WVHEPKGYANFCSGPCPYLRS - - A	DYTHSTVLGLYN
hInh-a	SFQ - ELGWERWIVVYPPSFIFHYCHGGCGLHIIPPNNL	PVPGAPPPTPAQP
HMIS	DLR - A . . . ERSVLIPIETYQANNCQGVCGWPQSDRNP	RYGNHVVLLKM
hGDNF	NVT - DLGLG . . . YETKEELIFRYCSCGSCDAET	TYDKILKNLSRN
Consensus	f . . . g w . . w i a p . . % . a . y c	ha

FIG. 6B

15/17

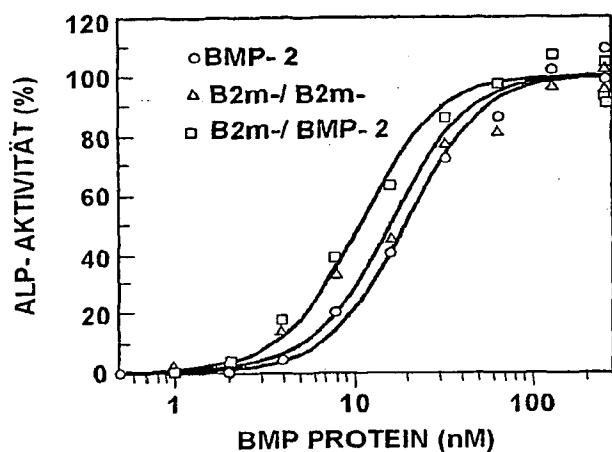
FIG. 6C

Consensus

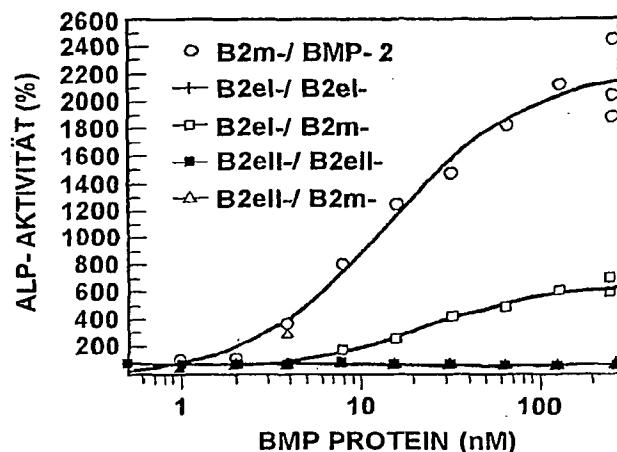
16/17

Fig. 7

A.



B.

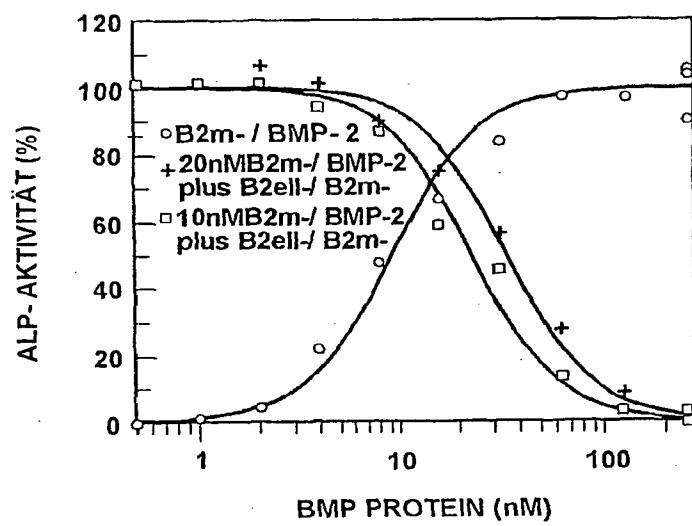


C.

	ALP 250	SD
B2m- / BMP- 2	2400	110
B2el- / B2el-	72	7
B2el- / B2m-	640	52
B2ell- / B2ell-	67	5
B2ell- / B2m-	80	5
MEDIUM	74	4

17/17

Fig. 8



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Sebald, Walter

<120> Mutein einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie
des Wachstumsfaktors TGF-beta

<130> p31262

<140>
<141>

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hBMP-2

<400> 1
Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
1 5 10 15

His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile
20 25 30

Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro
35 40 45

Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln
50 55 60

Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val
65 70 75 80

Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu
85 90 95

Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly
100 105 110

Cys Arg

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hBMP-4

<400> 2

Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys
 1 5 10 15

Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp
 20 25 30

Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly Asp
 35 40 45

Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile
 50 55 60

Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys
 65 70 75 80

Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu
 85 90 95

Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu Gly
 100 105 110

Cys Gly Cys Arg
 115

<210> 3
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> hBMP-3

<400> 3
 Gln Trp Ile Glu Pro Arg Asn Cys Ala Arg Arg Tyr Leu Lys Val Asp
 1 5 10 15

Phe Ala Asp Ile Gly Trp Ser Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe
 20 25 30

Asp Ala Tyr Tyr Cys Ser Gly Ala Cys Gln Phe Pro Met Pro Lys Ser
 35 40 45

Leu Lys Pro Ser Asn His Ala Thr Ile Gln Ser Ile Val Arg Ala Val
 50 55 60

Gly Val Val Pro Gly Ile Pro Glu Pro Cys Cys Val Pro Glu Lys Met
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Ser Ile Leu Phe Phe Asp Glu Asn Lys Asn Val Val Leu
 85 90 95

Lys Val Tyr Pro Asn Met Thr Val Glu Ser Cys Ala Cys Arg
 100 105 110

<210> 4
 <211> 132
 <212> PRT

85

90

95

Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp
 100 105 110

Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala
 115 120 125

Cys Gly Cys His
 130

<210> 6
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> hBMP-7

<400> 6
 Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
 1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
 20 25 30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
 35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
 50 55 60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
 65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
 85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
 100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
 115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 130 135

<210> 7
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> hBMP-8

<400> 7
 Ala Val Arg Pro Leu Arg Arg Arg Gln Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu

1

5

10

15

Pro Gln Ala Asn Arg Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Val His Gly Ser
 20 25 30

His Gly Arg Gln Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln
 35 40 45

Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala
 50 55 60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn
 65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro
 85 90 95

Asn Ala Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr
 100 105 110

Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His
 115 120 125

Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His
 130 135

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> hBMP-10

<400> 8

Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe
 1 5 10 15

Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu
 20 25 30

Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu
 35 40 45

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn
 50 55 60

Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys
 85 90 95

Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg
 100 105

<210> 9

<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hBMP-11-

<400> 9
Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys
1 5 10 15
Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
20 25 30
Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu
35 40 45
Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala
50 55 60
Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
65 70 75 80
Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly
85 90 95
Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
100 105

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hGDF-1

<400> 10
Asp Ala Glu Pro Val Leu Gly Gly Pro Gly Gly Ala Cys Arg Ala
1 5 10 15
Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly Trp His Arg Trp Val
20 25 30
Ile Ala Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr Cys Gln Gly Gln Cys Ala
35 40 45
Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly Gly Pro Pro Ala Leu Asn His
50 55 60
Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His Ala Ala Ala Pro Gly Ala Ala Asp
65 70 75 80
Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Val Leu Phe
85 90 95
Phe Asp Asn Ser Asp Asn Val Val Leu Arg Gln Tyr Glu Asp Met Val
100 105 110